

# 生物化学实验

复旦大学

朱 俭 曹凯鸣 周润琦 编著  
蔡武城 袁厚积

上海科学技术出版社



58.173057  
410

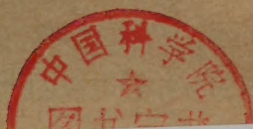
# 生物化学实验

复旦大学

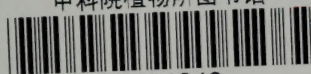
朱 俭 曹凯鸣 周润琦

编著

蔡武城 袁厚积



中科院植物所图书馆



S0011943

上海科学技术出版社

227570



# 生物化学实验

复旦大学

朱 俭 曹凯鸣 周润琦 编著  
蔡武城 袁厚积

上海科学技术出版社出版

(上海瑞金二路450号)

新华书店上海发行所发行 上海中华印刷厂印刷

开本 787×1092 1/32 印张 10.875 字数 228,000

1981年7月第1版 1981年7月第1次印刷

印数: 1—13,500

统一书号: 13119·924 定价: (科四)0.97 元



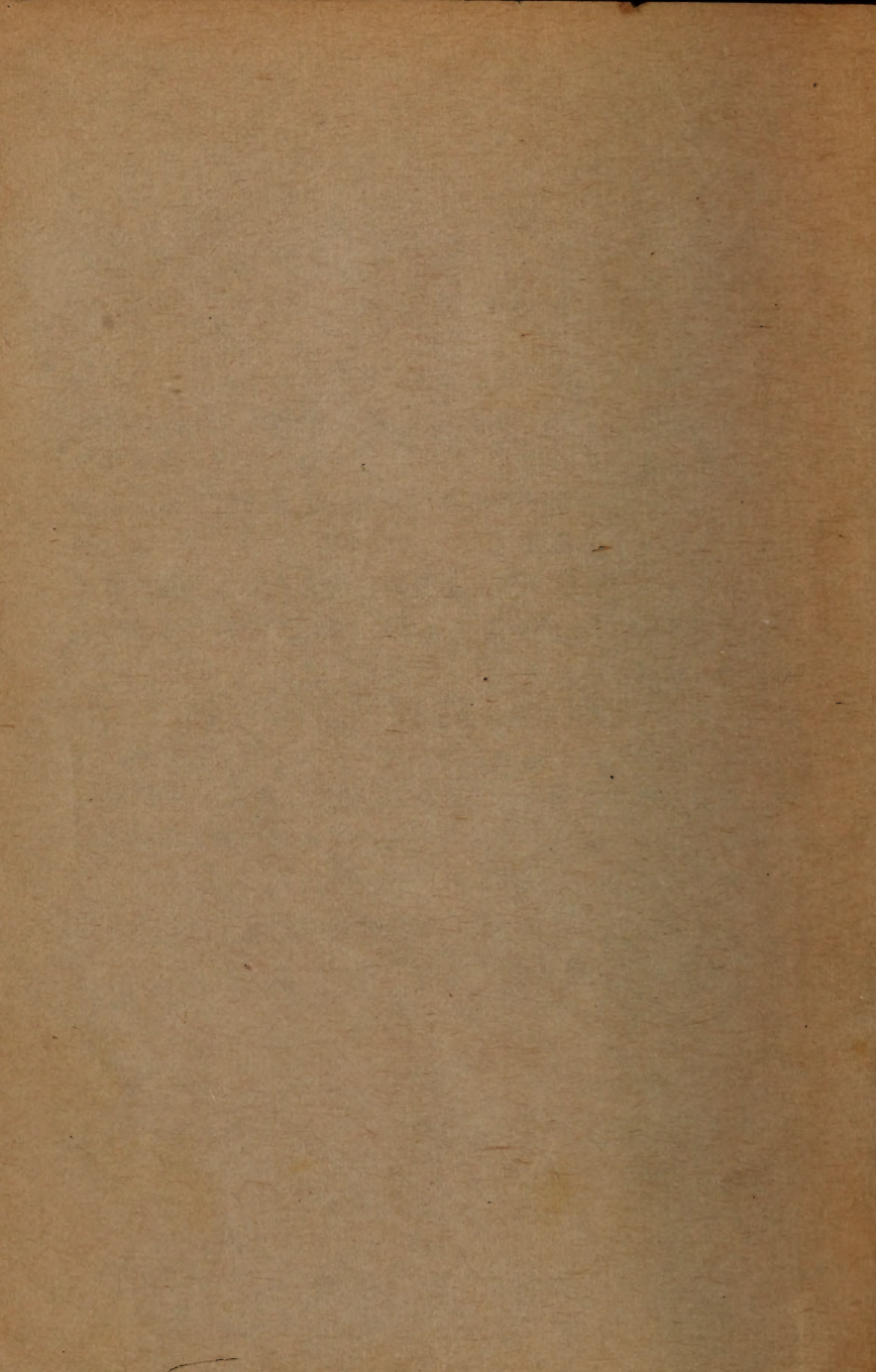
# 前 言

生物化学实验技术在生物科学特别是分子生物学的发展中起着很重要的作用，它与工业、农业、医药等各个方面都有十分广泛而又密切的联系，因此该项实验技术已成为生物科学研究中一个非常重要的手段，并列为各高等院校生物系及有关专业的实验必修课程。

鉴于从事这类科学研究工作的科技人员及高等院校有关专业的需要，我们在历年实验教学的基础上，并根据近年来生物化学实验技术的发展作了若干修改和充实，汇编成这本《生物化学实验》。内容包括生物物质——糖、脂肪、蛋白质、核酸和酶等的分析测定方法及其分离提取技术；物质代谢部分实验。我们力求在原理阐述上做到简单明了，方法上具体详尽，以适应初学者的要求，并对同一类物质的测定和分离分析选用几种不同的实验方法，供读者选择参考。

限于我们的经验和水平，本书不免还存在不少缺点和问题，恳请读者不吝指正。

编 者





# 目 录

一、糖化学	1
1. 总糖和还原糖测定(一)——3,5-二硝基水杨酸法	1
2. 总糖和还原糖测定(二)——斐林氏法	4
3. 总糖和还原糖测定(三)——碱性铜试剂法	9
4. 糖的硅胶G薄层层析	12
5. 糖的聚酰胺薄膜层析	15
二、脂肪化学	19
6. 脂肪皂化值测定	19
7. 脂肪碘值测定	21
8. 脂肪酸值测定	23
9. 油料作物脂肪抽提和含量测定	25
三、有机酸化学	27
10. 柠檬酸的提取——离子交换树脂法	27
四、蛋白质化学	33
11. 人发中提取胱氨酸	33
12. 面粉中赖氨酸含量测定	35
13. 氨基酸双向纸层析	39
14. 氨基酸纤维素薄层层析	43
15. 缓冲液的性质	45
16. 蛋白质的电荷	49
17. 蛋白质等电点测定	51
18. 总氮测定(一)——常量克氏定氮法	53
19. 总氮测定(二)——微量克氏定氮法	56



20. 氨基氮测定——甲醛滴定法	61
21. 蛋白质浓度测定(一)——福林-酚试剂法	64
22. 蛋白质浓度测定(二)——染色测定法	66
23. 血清蛋白质醋酸纤维薄膜电泳	69
24. 胎儿甲种球蛋白对流免疫电泳	73
25. 血清蛋白质聚丙烯酰胺凝胶电泳	76
26. 血清脂蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳	83
27. 蛋白质N-末端测定	86
28. 珠蛋白的制备及其N-末端测定	94
✓ 29. 葡聚糖凝胶层析特性	98
30. 蛋白质分子量测定(一)——SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法	104
31. 蛋白质分子量测定(二)——葡聚糖凝胶过滤法	110

## 五、核酸化学 117

32. 生物材料中总磷量测定——比色法	117
33. 核糖核酸定量测定——改良苔黑酚法	120
34. 脱氧核糖核酸定量测定——改良二苯胺法	124
35. 紫外吸收法测定核酸及核苷酸含量	127
36. 动物组织细胞内核酸(DNA与RNA)含量测定	133
I. 肝脏组织中DNA和RNA的分离	133
II. 肝脏组织中DNA和RNA含量测定	136
37. 动物肝脏组织中核糖核酸的提取	140
38. 脱氧核糖核酸(DNA)的提取	142
I. 动物组织中DNA的提取	142
II. 细菌中DNA的提取	145
39. 从酵母中制备5'-核苷酸	149
I. 酵母核糖核酸的提制	149
II. 核糖核酸的酶解	153
III. 5'-核苷酸定量测定——过碘酸氧化法	156

IV. 单核苷酸的离子交换柱层析分离 .....	159
V. 单核苷酸的纸电泳法鉴定 .....	166
40. 脱氧核糖核酸的碱基组成及其含量测定 .....	169
✓41. DEAE-纤维素薄层层析——核苷及核苷酸的分离; AMP、ADP 及 ATP 的分离 .....	172
42. 核糖核酸碱水解产物的琼脂糖电泳鉴定 .....	175
43. ECORI 酶解 $\lambda$ 噬菌体 DNA 片段的电泳分离 .....	178
六、酶 .....	182
44. 酶在生物组织中的分布和某些因素对酶的影响 .....	182
45. 1398 中性蛋白酶活力测定 .....	186
46. 脂肪酶活力测定 .....	190
47. 蔗糖酶的纯化和比活力测定 .....	193
48. 蔗糖酶进程曲线的制作及不同酶浓度对反应速度的 影响 .....	199
49. 蔗糖酶的米氏常数 $K_m$ 和最适 pH 测定 .....	204
50. $\alpha$ -半乳糖苷酶酶学性质测定 .....	211
✓ 0 I. 进程曲线的制作 .....	211
II. pH 对酶活性的影响及酸碱稳定性测定 .....	214
III. 温度对酶活性的影响及热稳定性测定 .....	217
IV. 米氏常数测定 .....	220
V. 抑制剂类型的判断及抑制常数 $K_i$ 测定 .....	226
✓51. 用正交试验设计法测定几种因素对溶菌酶活性的影响 .....	234
52. 酶的超过滤浓缩 .....	244
53. 固相 5'-磷酸二酯酶的制备 .....	249
七、代谢 .....	256
54. 发酵过程中无机磷的利用 .....	256
55. 糖酵解中间产物的鉴定 .....	257
56. 脱氢酶活性测定 .....	260
57. 脂肪酸 $\beta$ -氧化 .....	262



58. 氨基移换反应	266
<b>八、附录</b>	270
1. 市售浓酸和氨水的比重和浓度	270
2. 标准溶液的制备和标定	270
3. 一些层析滤纸的规格与性能	273
4. 各种离子交换树脂类似商品对照表	274
5. 国产离子交换树脂的物理常数	276
6. 葡聚糖凝胶 Sephadex 的物理性质	281
7. 常用参考蛋白质的分子量	282
8. 常用核酸类物质常数表	284
9. 酸碱指示剂	292
10. 缓冲液配制方法	293
11. pH 计测溶液 pH 的原理和步骤	309
✓ 12. 分光光度法	313
<b>九、参考文献</b>	323



# 一、糖 化 学

## 1. 总糖和还原糖测定(一)

### ——3,5-二硝基水杨酸法

#### 一、目的

掌握还原糖和总糖的测定原理,学习用比色法测定还原糖的方法。

#### 二、原理

糖的测定方法有物理的和化学的两类。物理方法有测定其折光率、比旋度的变化,也可利用比重计进行测定。比较精确和常用的是化学测定法。

还原糖的测定是糖定量测定的基本方法。还原糖就是指含有自由醛基或酮基的糖类,单糖都是还原性糖,双糖和多糖不一定是还原糖,其中乳糖和麦芽糖是还原糖。利用单糖、双糖与多糖的溶解度不同可把它们分开,并且可以用酸水解法使没有还原性的双糖和多糖,彻底水解成具有还原性的单糖,再进行测定,这样就可以分别求知样品中总糖和还原糖的量。

本实验是利用3,5-二硝基水杨酸与还原糖共热后被还原成棕红色的氨基化合物,在一定浓度范围内,还原糖的量和棕红色物质颜色的深浅程度成一定比例关系,可以用分光光度计进行测定。本方法的优点是快速,杂质干扰较小。

#### 三、实验材料,仪器和试剂

## 1. 实验材料

山芋粉; pH 试纸。

## 2. 仪器

容量瓶 100 毫升( $\times 3$ ); 玻璃漏斗 6 厘米( $\times 2$ ); 吸管 1 毫升( $\times 9$ ), 10 毫升( $\times 3$ ); 量筒 10 毫升( $\times 1$ ), 100 毫升( $\times 1$ ); 大试管  $3.0 \times 20$  厘米( $\times 8$ ); 试管  $1.5 \times 15$  厘米( $\times 12$ )。

72 型分光光度计; 电热恒温水浴箱; 水浴锅。

## 3. 试剂

3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 试剂: 6.3 克 DNS 和 262 毫升  $2N$  氢氧化钠, 加到 500 毫升含有 182 克酒石酸钾钠的热水溶液中, 再加 5 克重蒸酚和 5 克亚硫酸钠, 搅拌溶解, 冷却后加水定容至 1000 毫升, 贮于棕色瓶中。

1000 微克/毫升葡萄糖标准溶液: 准确称取干燥恒重的葡萄糖 1 克, 加少量水溶解后再加 8 毫升  $12N$  浓盐酸 (防止微生物生长), 以蒸馏水定容至 1000 毫升。

$6N$  盐酸;  $6N$  氢氧化钠。

## 四、操作步骤

### 1. 葡萄糖标准曲线制作

取 5 支大试管按表加入 1000 微克/毫升标准葡萄糖液及

管号	1000微克葡萄糖/毫升 (毫升)	H <sub>2</sub> O (毫升)	葡萄糖最终浓度 (微克/毫升)
1	1	9	100
2	2	8	200
3	4	6	400
4	6	4	600
5	8	2	800

蒸馏水,得到从 100 微克/毫升至 800 微克/毫升标准管。

分别吸取上述不同浓度的葡萄糖溶液 0.5 毫升, 3,5-二硝基水杨酸试剂 0.5 毫升, 混合均匀, 在沸水浴上加热 5 分钟, 取出后用水冷却, 每管再加入 4 毫升蒸馏水稀释, 最后在 72 型分光光度计上以 540 毫微米比色测出光密度值(OD)。另做一空白试验, 即用蒸馏水代替葡萄糖, 其他试剂相同, 在测光密度值时, 以此管作空白, 调光密度到零。

管号	含糖量 (微克)	葡萄糖液		DNS试剂 (毫升)	沸水浴加热五分钟后冷水冷却	H <sub>2</sub> O (毫升)	OD <sub>540</sub>
		浓 度 (微克/毫升)	用量 (毫升)				
1	50	100	0.5	0.5		4	
2	100	200	0.5	0.5		4	
3	200	400	0.5	0.5		4	
4	300	600	0.5	0.5		4	
5	400	800	0.5	0.5		4	
6	0	H <sub>2</sub> O	0.5	0.5		4	

以葡萄糖含量(微克)为横坐标、光密度值为纵坐标作出葡萄糖标准曲线。

## 2. 山芋粉中还原糖和总糖的测定

(1) 样品中还原糖提取: 称取山芋粉 1.00 克放在大试管中, 先以少量水调成糊状, 再加 50~60 毫升水摇匀后, 50℃保温 20 分钟, 使还原糖浸出, 在容量瓶定容到 100 毫升, 经过滤, 取滤液测还原糖。

(2) 样品中总糖的水解和提取: 称取山芋粉 0.50 克, 放在大试管中, 加入 6N 盐酸 10 毫升, 水 15 毫升, 放沸水浴上



加热水解半小时，冷却后加入 6N 氢氧化钠溶液，调 pH 达到中性，并用容量瓶定容到 100 毫升，经过滤，取滤液 10 毫升稀释至 100 毫升，即为稀释 1000 倍的总糖水解液。

(3) 定糖：取上述还原糖和总糖的提取稀释液各 0.5 毫升，加入 DNS 试剂，与葡萄糖标准曲线制作同样处理。

管号	样品量 (毫升)		DNS试剂 (毫升)	沸水浴加热五分钟后冷水冷却	H <sub>2</sub> O (毫升)	OD <sub>540</sub>	山芋粉内含糖 (%)
7	还	0.5	0.5		4		
8	原	0.5	0.5		4		
9	糖	0.5	0.5		4		
10	总	0.5	0.5		4		
11		0.5	0.5		4		
12	糖	0.5	0.5		4		

将样品所测得的 OD 值，在标准曲线上，查出相应的还原糖量，并按下式计算出山芋粉内含还原糖和总糖的百分量。

$$\text{还原糖}\% = \frac{\text{还原糖毫克数} \times \text{样品稀释倍数} \times 100}{\text{样品量} \times 0.5}$$

$$\text{总糖}\% = \frac{\text{水解后还原糖毫克数} \times \text{样品稀释倍数} \times 0.9 \times 100}{\text{样品量} \times 0.5}$$

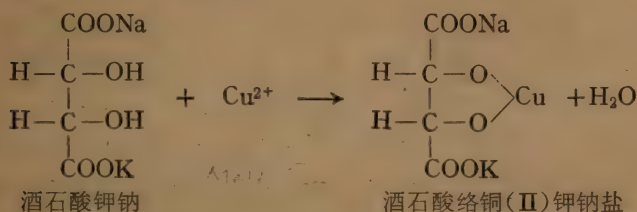
## 2. 总糖和还原糖测定(二)——斐林氏法

### 一、目的

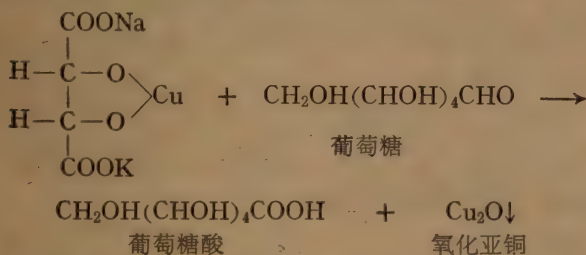
学习掌握生产实践中常用的快速定糖方法。

### 二、原理

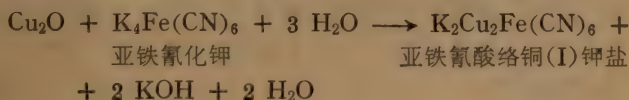
还原糖在碱性溶液中能将  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  等金属离子还原, 而糖本身则氧化成各种羟酸, 利用这一特性可以对还原糖进行定量测定。本实验采用斐林试剂热滴定法, 氧化剂是斐林试剂, 它是由甲乙两种溶液组成, 甲液中含有硫酸铜、次甲基蓝; 乙液中含有氢氧化钠、酒石酸钾钠和亚铁氰化钾(黄血盐)。当甲乙两液混合时, 硫酸铜和氢氧化钠作用形成氢氧化铜沉淀, 由于溶液中存在酒石酸钾钠, 它和氢氧化铜形成了可溶性络合物。



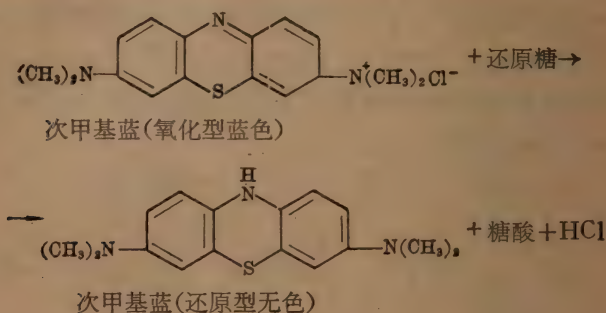
酒石酸络铜(II)钾钠盐在与还原糖共热时, 二价铜离子即被还原成一价的氧化亚铜红色沉淀。



此氧化亚铜与试剂中亚铁氰化钾反应生成可溶性的亚铁氰酸络铜(I)钾盐。



斐林试剂中二价铜的还原力比次甲基蓝强，因此所滴入的标准葡萄糖溶液首先使二价铜还原，只有当二价铜被还原完毕后，才能使次甲基蓝(甲烯蓝)还原为无色，测定中以此作为滴定终点。



在测定时先做一对照管(不加样品)，用标准葡萄糖滴定求知一定体积斐林试剂中二价铜和次甲基蓝的量，即测定对照管消耗的标准葡萄糖量(A)。再做样品管，样品中还原糖消耗斐林试剂中一部分二价铜，剩余的量再用标准葡萄糖来滴定，即样品消耗的标准葡萄糖量(B)。将(A)减去(B)就可求得样品中还原糖量。

### 三、实验材料、仪器和试剂

#### 1. 实验材料

山芋粉；广范试纸 pH1~12。

#### 2. 仪器

吸管 5 毫升(×4)，10 毫升(×2)；容量瓶 100 毫升(×3)；烧杯 150 毫升(×1)，100 毫升(×1)；三角烧瓶 250 毫升(×6)；滴定管 25 毫升(×1)；双孔橡皮塞；电炉 300W(×1)；天平。

#### 3. 试剂



斐林氏甲液：15 克硫酸铜、0.05 克次甲基蓝溶于 1 升蒸馏水中。

斐林氏乙液：50 克酒石酸钾钠、54 克氢氧化钠、4 克亚铁氰化钾溶于 1 升蒸馏水中。

0.1% 标准葡萄糖溶液：准确称取干燥恒重的葡萄糖 1.00 克，加入少量蒸馏水溶解后，再加 8 毫升浓盐酸（防止微生物生长），蒸馏水定容至 1 升。

6N 盐酸；6N 氢氧化钠。

#### 四、操作步骤

(1) 还原糖提取：称取 2.00 克山芋粉，在小烧杯中先用少量水调成糊状，再加入 70 毫升水，50℃ 保温 15 分钟，取出后在 100 毫升容量瓶中定容至 100 毫升，经过滤，取滤液进行还原糖测定。

(2) 总糖水解：称取 1.00 克山芋粉在小烧杯中，加 6N 盐酸 10 毫升，蒸馏水 15 毫升，在沸水浴上加热半小时，取出后用 6N 氢氧化钠中和至中性，然后定容至 100 毫升，经过滤，取滤液 10 毫升稀释至 100 毫升，即为稀释 1000 倍的总糖水解液。

(3) 糖的定量测定：按图 1 装置热滴定仪器。在三角瓶中按下表加入各试剂。在加入斐林试剂甲液和乙液后，为了

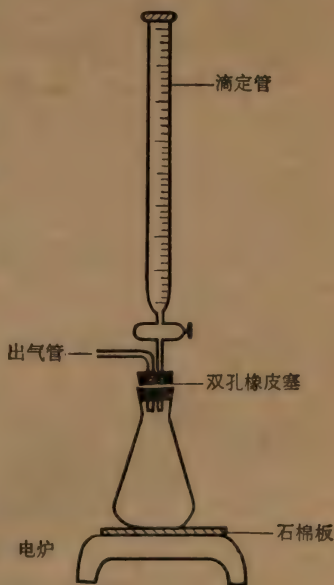


图 1 斐林氏热滴定装置

保证处于沸腾状态下快速滴定（整个滴定时间在三分钟内完成），在滴定前先从滴定管中加入适量的葡萄糖液，然后在沸腾状态下以 4~5 秒一滴的速度，继续自滴定管加入葡萄糖液，直至蓝色消失停止滴定。由于还原型的次甲基蓝遇到空气后又能转为氧化型，而恢复蓝色，因此当滴定到蓝色刚消失，出现黄色时应立即停止滴定，如果再现蓝色切勿继续滴定。

瓶号	斐林氏试剂		还原糖 提取液 (毫升)	总 糖 水解液 (毫升)	0.1% 葡萄 糖初滴入量 (毫升)	加热至沸 腾状态	0.1%葡萄 糖滴定总量 (毫升)
	甲液 (毫升)	乙液 (毫升)					
1	5	5	—	—	7		
2	5	5	—	—	7		
3	5	5	5	—	—		
4	5	5	5	—	—		
5	5	5	—	5	—		
6	5	5	—	5	—		

## 五、计算

按下式分别计算山芋粉中还原糖和总糖的百分量。

$$\text{还原糖}\% = \frac{(A-B) \times \text{葡萄糖浓度mg/ml} \times \text{样品稀释倍数}}{\text{吸取测定毫升数} \times \text{样品量}} \times 100$$

$$\text{总糖}\% = \frac{(A-B) \times \text{葡萄糖浓度mg/ml} \times \text{样品稀释倍数}}{\text{吸取测定毫升数} \times \text{样品量}} \times 100$$

上式中 A 为空白所耗葡萄糖毫升数，B 为样品溶液所耗葡萄糖毫升数。

### 3. 总糖和还原糖测定(三)

#### ——碱性铜试剂法

##### 一、目的

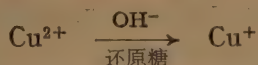
学习用碱性铜试剂法测定生物材料中总糖和还原糖的含量。

##### 二、原理

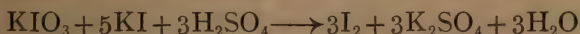
还原性糖与碱性铜试剂一起加热后, 试剂内二价铜离子就被还原成一价铜离子, 形成氧化亚铜的红色沉淀, 这样的一价铜在酸性条件下又被试剂中过量的碘氧化, 然后用硫代硫酸钠来滴定剩余的碘量, 就可计算出还原糖的含量。

实验过程中所包含的化学反应如下:

(1) 二价铜离子在碱性条件下被还原性糖还原为一价铜离子:



(2) 试剂中过量的碘是以碘酸钾与碘化钾的形式存在, 在应用时, 随时加入硫酸酸化, 碘就释放出来:



(3) 一价的铜离子在酸性条件下被碘氧化, 消耗了一部分碘:



(4) 剩余的碘, 用标准硫代硫酸钠来滴定:



由于被还原的铜量与还原糖之间的关系十分复杂, 它和糖的浓度、试剂的浓度、反应温度和时间等因素有关, 因此在测定样品时, 必须在相同条件下做一条已知糖浓度的标准曲



线,从标准曲线上找出样品的含糖量。

### 三、实验材料,仪器和试剂

#### 1. 实验材料

山芋粉; 广范试纸 pH1~12; 滤纸。

#### 2. 仪器

容量瓶 100 毫升( $\times 3$ ); 量筒 50 毫升( $\times 1$ ); 吸管 1 毫升( $\times 4$ ), 5 毫升( $\times 2$ ), 10 毫升( $\times 1$ ); 大试管  $3.0 \times 20$  厘米( $\times 13$ ); 滴定管 25 毫升( $\times 1$ ); 漏斗 6 厘米( $\times 2$ )。

#### 3. 试剂

10% 氢氧化钠; 6*N* 盐酸; 5*N* 硫酸; 标准葡萄糖溶液 1 毫克/毫升; 1% 淀粉溶液。

0.005*N* 硫代硫酸钠溶液: 称取 1.24 克  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  溶解在蒸馏水中, 定容至 1 升。

碱性铜试剂: 25 克无水碳酸钠和 25 克酒石酸钾钠溶解在 500 毫升蒸馏水中。再加入 10% 硫酸铜溶液 75 毫升(7.5 克  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  溶解在 75 毫升水中), 两液混合时应慢慢加入并迅速捣拌。称碳酸氢钠 20 克, 碘化钾 5 克, 加到上述溶液中搅拌使溶解。取 150 毫升 0.1*N* 碘酸钾溶液(150 毫升中含有碘酸钾 3.210 克), 加到上述溶液中, 最后用蒸馏水定容至 1 升。

### 四、操作步骤

#### 1. 样品中还原糖提取

称取山芋粉 1.00 克, 放在大试管中, 先用少量水调成糊状, 再加入 50 毫升水, 使搅拌均匀, 放在  $50^\circ\text{C}$  水浴上保温半小时, 取出后定容至 100 毫升, 再经过滤, 滤液进行还原糖测定。

#### 2. 样品中总糖的提取和水解

称取山芋粉 1.00 克, 放在大试管中用少量水调成糊状后,

再加入 15 毫升水和 6*N* 盐酸 10 毫升，搅拌均匀后放在沸水浴上水解半小时，冷却后用 10% 氢氧化钠中和至 pH 呈中性，然后定容至 100 毫升，过滤，取滤液 10 毫升定容至 100 毫升，成稀释 1000 倍的总糖水解液。

### 3. 还原糖测定

取 11 支大试管，按下表次序加入试剂。

管号	葡萄糖量 (毫克)	1毫克/ 毫升标准葡萄糖溶液 (毫升)	还原样品 (毫升)	总糖样品 (毫升)	H <sub>2</sub> O (毫升)	碱性铜试剂 (毫升)	沸水浴中加热十五分钟，放冷水中冷却至 30 ~ 40 °C	5 <i>N</i> H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (毫升)	0.005 <i>N</i> Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 滴定数 (毫升)
1	—	—			5	5		1	
2	—	—			5	5		1	
3	0.2	0.2			4.8	5		1	
4	0.4	0.4			4.6	5		1	
5	0.6	0.6			4.4	5		1	
6	0.8	0.8			4.2	5		1	
7	1.0	1.0			4.0	5		1	
8			1		4.0	5		1	
9			1		4.0	5		1	
10				1	4.0	5		1	
11				1	4.0	5		1	

(1) 准确地吸取糖液和铜试剂于大试管中，混合均匀后在沸水浴中加热十五分钟。

(2) 在流动水中冷却，不可摇动。

(3) 加入 5*N* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 毫升，轻轻摇动。

(4) 用 0.005*N* Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 滴定剩余的碘量，当碘的颜色

接近消失，达滴定终点前，加入 1% 淀粉溶液三滴作指示剂，继续滴定至蓝色消失。

(5) 将空白管(1、2 二管)所用的硫代硫酸钠的平均值减去含糖溶液所用硫代硫酸钠的体积，即该糖溶液实际所消耗的碘量，以此值作为横坐标，含糖量作为纵坐标，作出标准曲线。然后样品还原糖和总糖的滴定值在标准曲线上分别找出相应的含糖量，再各自乘上它的稀释倍数，即可求出山芋粉样品含总糖和还原糖的百分数。

#### 4. 糖的硅胶 G 薄层层析<sup>[1]</sup>

##### 一、目的

了解并掌握吸附层析的原理，学习薄层层析的一般操作及定性鉴定方法。

##### 二、原理

薄层层析是一种微量而快速的层析方法。把吸附剂或支持剂均匀地涂布于玻璃板(或涤纶片基)上成一个薄层，把要分析的样品加到薄层上，然后用合适的溶剂进行展开而达到分离、鉴定和定量的目的。因为层析是在吸附剂或支持剂的薄层上进行的，所以称它为薄层层析。

为了使所要分析的样品的各组分得到分离，必须选择合适的吸附剂。硅胶、氧化铝和聚酰胺由于它们的吸附性能良好，是应用最广泛的吸附剂，硅藻土和纤维素则是分配层析中最常用的支持剂。在吸附剂或支持剂中添加了合适的粘合剂后再涂布，可使薄层粘牢在玻璃板上。硅胶 G 就是已经加入石膏的层析用吸附剂，它可以把一些物质自溶液中吸附到它的表面上，利用它对各种物质的吸附能力的不同，再用适当的溶剂系统展层就可以达到使不同物质分离的目的。



薄层层析对于低分子量的糖的分析提供了一个简便、迅速和灵敏的方法。糖在硅胶G薄层上的移动速度与糖的分子量和羟基数有关,经适当溶剂系统展开后样品移动距离如下:戊糖>己糖>双糖>三糖。若采用弱酸盐溶液(如醋酸钠溶液)代替水来调制硅胶G制成的薄层能提高糖的分离效果。

为了控制薄层的厚度以及得到恒定的  $R_f$  值,必须控制吸附剂颗粒的大小。吸附剂颗粒大小不适会影响层析的速度和分离效果,一般无机吸附剂直径在 0.07~0.1 毫米,薄层厚度在 0.25~1 毫米较为合适;有机吸附剂的颗粒可略大,直径在 0.1~0.2 毫米,薄层厚度在 1~2 毫米较适宜。

薄层层析的原理与纸层析、柱层析相似,同时又兼备这二种层析的优点:

1. 观察结果、显色方便,如薄层由无机物制成,可用腐蚀性显色剂;
2. 层析时间短;
3. 微量, 0.1 至数十微克样品均可分离,比纸层析灵敏度大 10~100 倍。

若薄层铺得厚些也可进行几百毫克样品的制备。由于这些原因加之操作方便,设备简单,薄层层析应用很广泛。

### 三、实验材料,仪器和试剂

#### 1. 材料

1%标准糖溶液:木糖、葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖、棉籽糖分别以 75%乙醇配成 1%的溶液。

1%标准糖混合溶液:上述各种糖混合后以 75%乙醇配成各种糖为 1%浓度的溶液。

硅胶G(层析用, E. Merck)。

#### 2. 仪器

烧杯 50 毫升( $\times 1$ ); 玻璃板  $20 \times 20$  厘米( $\times 1$ ); 层析缸  $25 \times 30$  厘米; 毛细管 0.5 毫米直径; 玻棒; 喷雾器。

烘箱; 尺; 铅笔。

### 3. 试剂

0.02 M 醋酸钠(NaAc, 分析纯)。

层析溶剂系统: 氯仿: 甲醇 = 60:40(V/V)。

苯胺-二苯胺-磷酸显色剂: 1 克二苯胺, 1 毫升苯胺和 5 毫升 85% 磷酸溶于 50 毫升丙酮中。

## 四、操作步骤

### 1. 硅胶 G 薄层的制备

制薄层用的玻板预先用洗液洗净并烘干, 玻璃板表面要求光滑。称取 8 克硅胶 G 加入 16 毫升 0.02 M 醋酸钠, 于烧杯中搅拌均匀后倒在玻板上, 倾斜玻璃板, 使硅胶 G 成为均匀的薄层。板于  $110^{\circ}\text{C}$  烘箱内烘 30 分钟, 取出供使用。制成的薄层要求表面平整, 厚薄均匀。

### 2. 点样

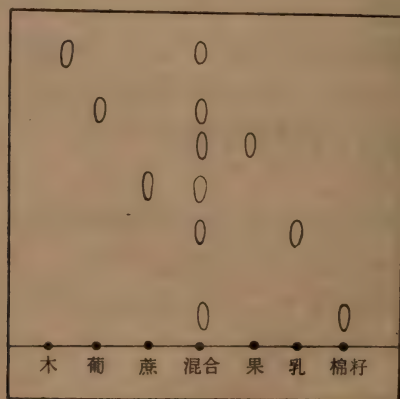


图 2 硅胶 G 薄层层析图谱(示意)

距薄板一端 1.5 厘米处每隔 2 厘米作一记号（用铅笔轻轻点一下，切不可将薄层刺破），共七点。用 0.5 毫米直径的毛细管吸取样品，各样品按图 2 点样一次，样品量在 5~50 微克内均可适用。控制点子直径不超过 2 毫米。

### 3. 展开

将薄板点样一端放入层析缸中，玻板不铺薄层一侧加层析溶剂以避免硅胶 G 从玻璃板上脱落，层析溶剂液面不得超过点样线。展层至溶剂前沿距顶端 0.5~1 厘米处时取出薄板（约二小时），在溶剂前沿处作记号。空气中晾干，除尽溶剂。

### 4. 显色

苯胺-二苯胺-磷酸显色剂均匀喷雾在薄层上，于 85°C 烘箱内加热至层析斑点显现，此显色剂可使各种糖显现出不同的颜色。根据各标准糖层析后所得斑点的位置确定混合样品中所分离出的各个斑点分别为何种糖。苯胺-二苯胺-磷酸显色剂显色后糖的颜色如下表：

糖	木糖	葡萄糖	果糖	蔗糖	棉籽糖
呈色	黄绿	灰蓝绿	棕红	蓝褐	蓝灰

计算各斑点的  $R_f$  值。

## 5. 糖的聚酰胺薄膜层析<sup>[2]</sup>

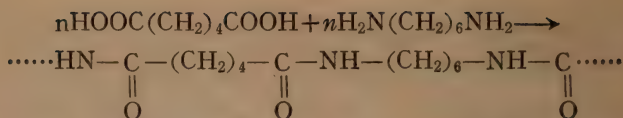
### 一、目的

学习用聚酰胺薄膜层析法定性分离糖。

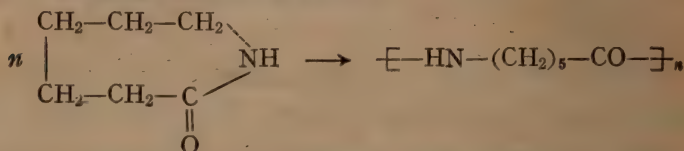
### 二、原理

聚酰胺(Polyamide)是一类称为锦纶的高分子物质。如由己二酸与己二胺聚合而成的称锦纶 66；

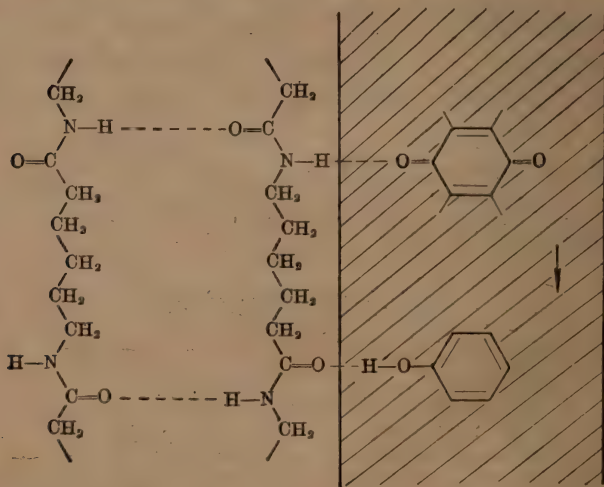




由己内酰胺聚合而成的称锦纶 6:



在这一类高分子中都含有大量酰胺基团,故统称聚酰胺,它对极性物质有吸附作用,目前已成为分离水溶性物质(或亲水物质)的主要方法之一。由于锦纶分子内的酰胺键能与酚类、酸类、醌类、硝基化合物等形成氢键,因而对这些物质产生了吸附作用,使聚酰胺具有特异的层析分辨性能。酚类(包括黄酮类、鞣质等)和酸类是以羟基(或羧基)与锦纶分子中的酰胺键



固定相(聚酰胺)

流动相(展层溶剂)

羰基形成氢键。芳香硝基化合物(包括 DNP-氨基酸)和醌类是以硝基(或醌基)与锦纶分子中的酰胺键的氨基形成氢键,被分离的物质由于其与锦纶形成氢键的能力不同,锦纶对其吸附力也不同,在层析中,展层溶剂与被分离物在聚酰胺粒子表面竞相形成氢键。在实验中选择适当的展层溶剂,各被分离物质在溶剂与聚酰胺表面之间的分配系数有差异,经吸附与解吸的展层过程而形成一个分离顺序,达到分离目的。自发现聚酰胺对极性物质有吸附作用以来,即用于柱层析分离制备和薄板层析等,现在用聚酰胺薄膜又是进一步发展。将薄膜固定在载片上,质地均匀紧密层析性能更加优越。

本实验采用聚酰胺薄膜对八种糖进行单相层析,具有微量、快速、分辨率高的特点。

### 三、实验材料,仪器和试剂

#### 1. 实验材料

纯阿拉伯糖,乳糖,蔗糖,半乳糖,麦芽糖,果糖,葡萄糖,木糖各 5 毫克分别用 80% 乙醇 0.5 毫升溶解;聚酰胺薄膜(浙江黄岩化学分析材料厂商品)。

#### 2. 仪器

层析缸 12×20 厘米;烘箱;毛细管 1.0~1.5 毫米内径;喷雾器。

#### 3. 试剂

溶剂系统: 甲醇:甲酸乙酯=1:8(V/V)。

显色剂: 苯胺-二苯胺-磷酸(配法见实验 4)。

### 四、操作步骤

#### 1. 聚酰胺薄膜制备(或采用商品聚酰胺薄膜)

涤纶片基(上海感光胶片厂生产)切成 17×35 厘米,浸入 10% 氢氧化钠与工业乙醇(1:1)混合液过夜,以清水冲洗

干净直至膜面不挂水为止。洗净的片基趁湿贴在玻璃板上，两边贴上厚度为 0.4 毫米的聚氯乙烯条（作为控制膜的厚度用），待片基表面干燥后，将玻璃板放在通风柜的水平木板上（只有木板达到水平位置，才能使膜厚薄均匀）。

在 100 毫升烧杯内，称入锦纶 5 克，加甲酸(85%)25 毫升，用表面皿盖好，电磁搅拌溶解，约 2~3 小时后呈透明清液。将清液倒在水平板上的片基上，迅速用拉膜器推动，使液体均匀铺在片基上（甲酸易挥发具腐蚀性，需在通风柜内操作）。膜铺好后，关闭通风柜，让甲酸缓慢挥发过夜，次日取出，在空气中吹干，切勿用高温烘干以免薄膜变形和断裂。干后裁成所需大小。

## 2. 点样层析

取 10×10 厘米聚酰胺薄膜一张，在离底边 0.6 厘米处用铅笔轻轻地每隔 1 厘米画一点（共九点），然后用毛细管将各种糖分别点在标好的点子上，在混合样品的点子上点上各种糖的样品，每个样品点三次，直径不超过 2 毫米。待点样干后，将膜卷成圆筒形，用玻璃胶纸粘连，放在层析缸中层析，待溶剂前沿达到离膜顶端 0.3 厘米处取出，膜上溶剂挥发后进行显色。

## 3. 显色

在除尽层析溶剂的聚酰胺薄膜上喷显色剂，放 85℃ 烘箱内烘数分钟，即可看到棕黄色的斑点，各种糖的斑点颜色也略有差异，对照标准糖的  $R_f$  值分析样品中有何种糖。



## 二、脂 肪 化 学

### 6. 脂肪皂化值测定

#### 一、目的

测定脂肪的皂化值。

#### 二、原理

皂化一克脂肪所需的氢氧化钾的毫克数称为该脂肪的皂化值。本实验用过量的氢氧化钾乙醇溶液与脂肪起皂化作用，然后用标准的酸来滴定剩余的氢氧化钾。

皂化每一克分子的脂肪，需要三个克分子的氢氧化钾。如果组成某脂肪的脂肪酸的分子量是大的，那么皂化一克脂肪所需要的氢氧化钾的量就相应地小了，反之，组成某脂肪的脂肪酸的分子量是小的，那么皂化一克脂肪所需的氢氧化钾量就相应地大了，因此从皂化值就可估计组成脂肪的脂肪酸的分子量大小，下面的数字可以帮助我们了解这一点。

脂肪	分子量	皂化值
三丁酸甘油酯	302.2	557.0
三己酸甘油酯	554.4	303.6
三软脂酸甘油酯	806.8	208.6
三硬脂酸甘油酯	890.9	188.9
三油酸甘油酯	884.8	190.2

### 三、实验材料, 仪器和试剂

#### 1. 实验材料

菜油。

#### 2. 仪器

三角烧瓶 150 毫升( $\times 3$ ); 冷凝管; 胖肚吸管 15 毫升( $\times 1$ ); 酸式滴定管 25 毫升( $\times 1$ ); 水浴锅。

#### 3. 试剂

0.5N 标准氢氧化钾乙醇溶液; 0.5N 标准盐酸; 0.1% 酚酞乙醇溶液。

### 四、操作步骤

(1) 称样: 用差数法称取二份 1 克的菜油, 分别注入 150 毫升的三角烧瓶中, 在瓶上注上 1 和 2。

(2) 皂化: 按下表在三角烧瓶 1, 2 和 3 号中分别准确地加入 25 毫升 0.5N 氢氧化钾乙醇溶液。没有脂肪样品的 3 号烧瓶作为空白对照。将上述三个三角瓶接上冷凝管, 在煮沸的水浴上回流加热半小时进行充分皂化反应。

瓶号	菜油量 (克)	0.5N KOH (毫升)	在沸水浴上回流半小时	0.5N HCl (毫升)	皂化值
1	1	25			
2	1	25			
3	—	25			

(3) 滴定: 皂化完毕后取下三角瓶, 分别加入酚酞指示剂 2~3 滴, 然后用标准盐酸滴定至指示剂褪色为止。样品所消耗的盐酸量减去空白所耗盐酸量即可计算皂化一克脂肪所耗的氢氧化钾毫升数。

(4) 结果计算: 按下式计算皂化值。

$$\text{皂化值} = \frac{(a-b) \times 0.5 \times 56}{\text{脂肪重量(克)}}$$

式中:  $a$  为空白对照消耗的  $0.5N$  盐酸毫升数,  $b$  为脂肪样品所消耗的  $0.5N$  盐酸毫升数, 56 为氢氧化钾的分子量。

## 7. 脂肪碘值测定<sup>[3]</sup>

### 一、目的

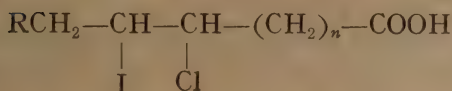
测定脂肪的碘值。

### 二、原理

100 克脂肪吸收碘的克数称为碘值。碘值是脂肪的一项重要常数, 它表示脂肪中双键的数目。

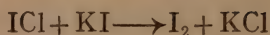
脂肪中的不饱和脂肪酸具有双键, 它能与卤素起加成作用。氯和氟与油脂作用剧烈, 除加成于双键外, 也能取代氢原子, 而碘在一定条件下主要是与双键起加成作用, 因此常用碘来测定脂肪的不饱和程度。每种脂肪都有它特有的碘值。本实验采用格尤布里-瓦列尔 (Гюбль-Валлер) 碘试剂法, 碘试剂是由碘的乙醇溶液和氯化高汞的乙醇溶液相混合, 产生氯化碘 ( $\text{HgCl}_2 + 2\text{I}_2 \longrightarrow \text{HgI}_2 + 2\text{ICl}$ ), 氯化碘比碘更易与脂肪起加成作用; 碘试剂中加入盐酸, 可使溶液更加稳定。实验中只要加入足够量的碘试剂使形成过量的氯化碘, 与不饱和脂肪起加成作用, 然后测定剩余的氯化碘, 从而计算出消耗的碘量, 其反应过程如下:

#### (1) 加成作用:





(2) 剩余氯化碘中碘的释放:



(3) 用硫代硫酸钠滴定释放出来的碘:



### 三、实验材料, 仪器和试剂

#### 1. 实验材料

菜油。

#### 2. 仪器

碘瓶 250 毫升( $\times 3$ ); 胖肚吸管 25 毫升( $\times 1$ ), 20 毫升( $\times 1$ ); 量筒 10 毫升( $\times 1$ ); 滴定管( $\times 1$ )。

#### 3. 试剂

碘试剂: (1)称取 25 克碘溶解在 500 毫升乙醇中; (2)称 30 克氯化高汞溶解在 500 毫升乙醇中。(1)与(2)溶液混和后, 再加入 25 毫升比重为 1.19 的盐酸。

0.1N 硫代硫酸钠溶液: 称取 24.8 克硫代硫酸钠( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )溶解在 1 升煮沸过的蒸馏水中, 再加入 0.1 克碳酸钠使溶液稳定。

氯仿(化学纯); 10% KI; 1% 淀粉溶液。

### 四、操作步骤

#### 1. 称样品

用差数法称取 0.1~0.2 克菜油样品两份, 分别放在干燥的碘瓶中, 加入氯仿 10 毫升并轻轻摇动, 使脂肪溶解, 在第三只碘瓶中同样加入 10 毫升氯仿, 但不加样品作为空白。

#### 2. 加碘试剂

用吸管准确吸取碘试剂 25 毫升于碘瓶中, 切勿使试剂与瓶口接触, 立即塞紧瓶塞, 轻轻摇动, 如发现瓶中颜色变浅褐

色时,表明试剂不够,必须再添加 10~15 毫升试剂,放置 1~2 小时后呈暗红色。如果在碘试剂加入后液体变混浊,这是因为油在乙醇中溶解不好而引起,可再加些氯仿使溶液澄清。

### 3. 使过剩的 $\text{ICl}$ 释放出 $\text{I}_2$

上述反应结束后,小心打开瓶塞,加入 20 毫升 10%  $\text{KI}$ ,然后用 5~10 毫升蒸馏水冲洗瓶塞及瓶颈。

### 4. 用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 滴定释放的 $\text{I}_2$

在用  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  滴定时要用力摇动,使  $\text{CHCl}_3$  中的  $\text{I}_2$  能与水层的  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  作用,待成黄色时再加入 5~10 滴淀粉溶液作为指示剂,至蓝色恰好退去时为滴定终点。

### 5. 计算碘值:按下式计算脂肪的碘值。

设空白所耗  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  毫升数为  $A$ ;

样品所耗  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  毫升数为  $B$ 。

碘的分子量为 127。

$$\text{碘值} = \frac{(A - B) \times \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ 浓度} \times 127}{\text{油重} \times 1000} \times 100$$

## 8. 脂肪酸值测定

### 一、目的

测定脂肪中游离脂肪酸的含量。

### 二、原理

脂肪或油类曝露在空气中日久之后,部分甘油酯即会分解产生游离的脂肪酸,使油脂变质酸败。因此测定脂肪中游离脂肪酸的含量是检验脂肪质量的主要指标之一。中和一克脂肪所需的氢氧化钾的毫克数称为“酸值”。脂肪酸败的程度用“酸值”表示,脂肪中脂肪酸含量越高,中和时氢氧化钾的消

耗量就越高,酸值越大,脂肪的质量也越差。

### 三、实验材料,仪器和试剂

#### 1. 实验材料

豆油或菜油。

#### 2. 仪器

三角烧瓶 150 毫升( $\times 3$ ); 碱式滴定管 25 毫升( $\times 1$ )。

#### 3. 试剂

乙醚和乙醇的等体积混合液: 以酚酞作指示剂, 用 0.1N 氢氧化钾调 pH 至中性。

0.1% 酚酞乙醇溶液。

0.1N 标准氢氧化钾溶液。

### 四、操作步骤

用差数法准确称取油样 3 克二份, 分别放在三角瓶中, 另取一个三角瓶不加油样作为空白, 在 3 个瓶中各加 50 毫升乙醚和乙醇混合液, 摇匀, 得透明溶液。如溶液呈混浊, 表示油没有全部溶解, 可再酌量增加溶剂, 使溶液呈透明为止。加入 0.1% 酚酞指示剂 1~2 滴, 用 0.1N 标准氢氧化钾溶液进行滴定至溶液呈粉红色为止, 从消耗的氢氧化钾量按下式计算可求得酸值。

瓶号	油重 (克)	乙醚和乙醇混合液 (毫升)	充分摇匀至透明	0.1% 酚酞 (滴)	0.1N KOH 滴定值 (毫升)	酸值
1	3	50		1~2		
2	3	50		1~2		
3	—	50		1~2		

$$\text{酸值} = \frac{\text{氢氧化钾滴定毫升数} \times 0.1 \times 56}{\text{油重量(克)}}$$

## 9. 油料作物脂肪抽提和含量测定

### 一、目的

学习脂肪的提取和测定方法。

### 二、原理

脂肪为三元醇(甘油)和脂肪酸结合成的酯类。脂肪的种类很多,它们的化学组成及物理性质各不相同,但它们都可溶解在脂溶性有机溶剂中。利用这一特性,在索氏抽提器中用石油醚对油料作物进行脂肪提取。提取脂肪后将石油醚蒸发去除,称取瓶中残留物的重量或称量样品损失的重量,即可求得该作物中脂肪的含量。

此法仅可应用于游离脂肪的提取,对结合脂肪不能提取;此外本法除能提取游离脂肪外,对游离脂肪酸、磷脂、固醇及色素等脂溶性物质也能一并抽提出来,所以抽提物称为粗脂肪。

### 三、实验材料,仪器和试剂

#### 1. 实验材料

油菜籽;脱脂滤纸  $15 \times 12$  厘米一张;脱脂棉花。

#### 2. 仪器

索氏脂肪抽提器(一套);分析天平;恒温水浴锅;烘箱;干燥器。

#### 3. 试剂

石油醚(化学纯,沸程  $30 \sim 60^{\circ}\text{C}$ )。

### 四、操作步骤

1. 样品先在  $100^{\circ}\text{C}$  烘箱中干燥  $3 \sim 4$  小时,并在研钵中研磨破碎,精确称取 5 克。

2. 取  $15 \times 12$  厘米脱脂滤纸一张,绕成圆筒形,底部褶起



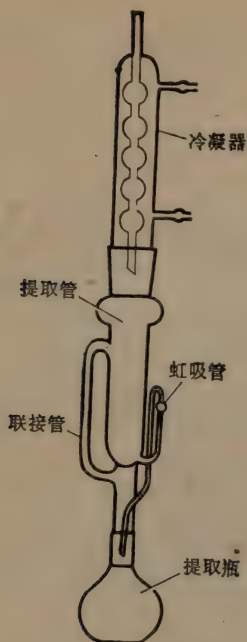


图 3 索氏抽提器

而封闭，使成为长 7 厘米直径 3 厘米的圆筒形纸包。将称好的样品倒入筒中，上部覆盖一层脱脂棉花以防样品溢出。

3. 洗净索氏提取瓶，在  $100\sim 105^{\circ}\text{C}$  烘箱内干燥 1 小时，放干燥器冷却后称重记下重量，加入石油醚达瓶容积的三分之二。将样品包放在索氏提取管中，按图 3 装置仪器，提取瓶在  $70\sim 80^{\circ}\text{C}$  水浴中加热抽提 16 小时左右。石油醚蒸气由联接管上升至冷凝器，凝结成液体，滴入提取管中。到一定高度后，溶有脂肪的石油醚经虹吸管流入提取瓶，如此循环抽提脂肪。

4. 提取完毕，取出滤纸包，并回收提取瓶中石油醚。洗净提取瓶外壁，放  $100\sim 105^{\circ}\text{C}$  烘箱中干燥后称重。

## 五、结果计算

按下式计算油菜籽中脂肪的百分含量。

设 A 为空的提取瓶重量，B 为提取的脂肪和提取瓶的总重：

$$\text{样品中脂肪含量}\% = \frac{B - A}{\text{样品重}} \times 100\%$$

### 三、有机酸化学

#### 10. 柠檬酸的提取

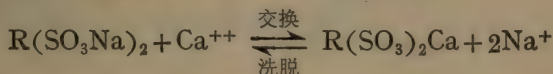
##### ——离子交换树脂法

##### 一、目的

通过应用离子交换树脂从发酵液中提取柠檬酸，学习离子交换分离提取法。

##### 二、原理

离子交换树脂是带有离子基团的不溶物质。这种离子基团能和周围溶液中的离子进行交换，而树脂本身物理性能不变。通常离子交换树脂，按所带基团可分为强酸( $-\text{SO}_3^-\text{H}^+$ )、弱酸( $-\text{COO}^-\text{H}^+$ )、强碱( $-\text{NR}_3^+\text{Cl}^-$ )、弱碱( $=\text{NH}$ ,  $-\text{NH}_2$ )四类。按照被分离物质的性质可选择适当的树脂。离子交换树脂在溶液中与相应的离子进行交换作用，例如强酸性阳离子树脂(钠型)和溶液中钙离子进行交换作用：



离子交换过程是可逆的，它服从质量作用定律，当添加足量的  $\text{Na}^+$  时，反应向洗脱方向进行，释放出  $\text{Ca}^{++}$ ，树脂再生为钠型，因此离子交换树脂可反复使用，一般二、三年内性能不致有显著衰退。

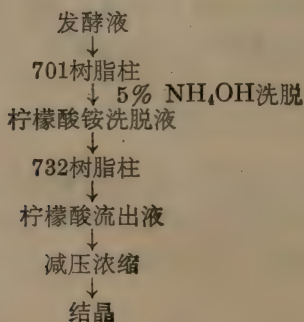
离子交换过程在柱中进行称为柱式法。柱内存放一定离子型的树脂，要分离的溶液流经交换柱，进行离子交换，然后

根据不同目的,采用取代法或洗脱法,将分离物从柱上交换下来。取代法通常用于物质的提取和浓缩,例如本实验的柠檬酸提取。洗脱法一般用于相似混合物的分离,根据这些被分离物与离子交换树脂的亲力的不同,采用不同 pH 缓冲液或不同离子强度洗脱液将其分别洗脱下来,例如混合氨基酸、核苷酸之类物质的分离。由于离子交换树脂具有上述特性,被广泛应用于生物化学物质的分离、提取和分析工作。

柠檬酸是带羟基的三元酸,其酸根能和碱性 701 树脂上的阴离子进行交换。当发酵液流经 701 树脂时,柠檬酸被浓缩在树脂上(根据静态吸附试验,弱碱性树脂 701 对柠檬酸交换容量最高可达每克树脂吸附 344 毫克柠檬酸),其他杂质从树脂上流出弃去。然后用稀氨水将柠檬酸从树脂上以铵盐形式取代下来。柠檬酸铵又通过另一根强酸性的 732 树脂  $H^+$  型柱,转型复原为柠檬酸,而从柱上流出。经收集浓缩后获得白色柠檬酸结晶。产品的纯度可用纸层析鉴定。

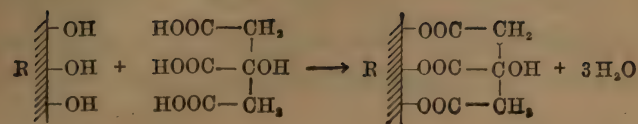
操作流程和反应式如下:

### 1. 流程



### 2. 反应式

(1) 吸附:

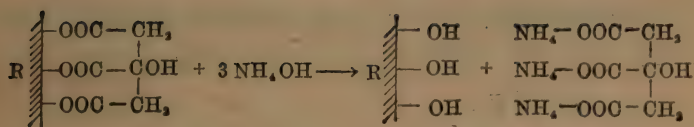


701(OH型)

树脂

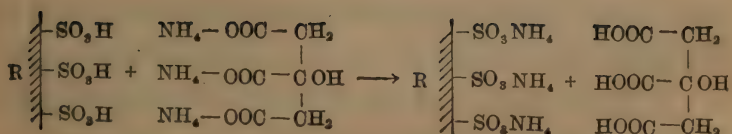
柠檬酸

(2) 洗脱:



柠檬酸铵

(3) 转型:



柠檬酸



### 三、实验材料, 仪器和试剂

#### 1. 实验材料

柠檬酸发酵液; 1% 柠檬酸标准液; 701 弱碱性阴离子树脂; 732 强酸性阳离子树脂; 层析滤纸  $15 \times 17$  厘米; 精密试纸 pH0.5~5.0, 广范试纸 pH1~12。

#### 2. 仪器

层析柱  $1 \times 20$  厘米(2 根); 灯泡瓶 100 毫升(1 只); 量筒 10 毫升( $\times 1$ ); 烧杯 100 毫升( $\times 2$ ); 层析缸  $28 \times 20$  厘米; 喷雾器; 镊子; 毛细管; 滴管。

#### 3. 试剂

5% 氨水; 2*N* 氢氧化钠; 2*N* 盐酸。

层析溶剂: 正戊醇: 甲酸: 水 = 100:32:100(V/V)。

0.04% 溴酚蓝显色剂: 25 毫克甲基黄、75 毫克溴酚蓝溶于 200 毫升 95% 乙醇中, 用 0.1*N* 氢氧化钠调至中性。

### 四、操作步骤

#### 1. 树脂处理

商品树脂含有极少量单体、反应物等, 必须去净并使树脂转成一定型式。将商品树脂 732 和 701 分别先用水漂洗, 除去树脂中悬浮的固体物质, 直到洗涤液澄清为止, 然后分别用 2*N* 氢氧化钠浸泡 2 小时, 倒去氢氧化钠后用蒸馏水洗到中性, 再分别用 2*N* 盐酸浸泡 2 小时, 倒去盐酸溶液后再用蒸馏水洗到中性。如此处理过的 732 和 701 树脂再次用 2*N* 氢氧化钠通过, 蒸馏水洗至中性, 这时 701 树脂已处理完毕, 树脂为 OH 型, 可以备用。732 树脂则再要用 2*N* 盐酸通过, 最后用蒸馏水洗到中性, 树脂转为 H 型, 即可备用。

#### 2. 装柱

在层析柱中装三分之一蒸馏水, 并排除柱下端出口处的

气泡,然后把已处理好的 701 树脂均匀地装入柱中,使树脂床高 8 厘米。另取一层析柱按相同方法把 732 树脂装入,树脂床高 16 厘米。层析柱装好后分别调节流速使达 1.5 毫升/分钟,并注意勿使水流干、树脂床露出水面。

### 3. 吸附与洗脱

上样前先把柱中高于 701 树脂床的溶液降到床表面,再小心地用滴管逐渐加入 15~20 毫升发酵液,并用精密 pH 纸测其流出液,当 pH 达 2.5~3.0 时停止上样,这时树脂已达饱和。然后用蒸馏水洗树脂柱,并测 pH 值,当 pH 达 4.5~5 时停止洗涤。取 5% 氨水 10 毫升,用滴管加入柱内,这时流出液要收集在容器中,当 pH 达 5~6 时为洗脱高峰,继续收集到 pH 达 11 时停止。此柠檬酸铵收集液准备上 732 树脂柱。

### 4. 转型

先把装好的 732 树脂柱中的溶液降到床表面,再把从 701 树脂上收集的柠檬酸铵溶液加到柱上,流出液开始时 pH 较高,约为 5~6 左右,此液弃去。直到流出液 pH 达到 2.5~3.0 时开始收集,这时 pH 还会不断下降,至 pH 再恢复至 2.5~3.0 时停止收集。流出液即为柠檬酸。

### 5. 浓缩结晶

收集的柠檬酸溶液放在灯泡瓶中,在水浴上加热并水泵抽气,减压浓缩至粘稠状为止。在瓶中加入几颗柠檬酸晶种,放入冰箱结晶很快就析出。

### 6. 树脂再生

701 树脂柱先以蒸馏水洗到 pH9,用 15 毫升 2N 氢氧化钠通过此柱进行再生,然后再用蒸馏水洗至中性,即可进行第二次交换。732 树脂的再生是先用蒸馏水洗至中性,再用 30

毫升  $2N$  盐酸进行再生，然后以蒸馏水洗到中性即可重复应用。

#### 7. 纯度鉴定

结晶析出后，进行纸层析鉴定其纯度。取  $15 \times 17$  厘米层析滤纸一张，在离纸一端 2 厘米处用铅笔划一基线。取少量结晶溶解在蒸馏水中，点样在滤纸的基线中间，在此点子的两边间隔 2 厘米处，分别点上发酵液和标准柠檬酸液。待点子干燥后用正戊醇和甲酸配制的溶剂进行展层，约 4 小时左右，取出滤纸并吹净溶剂，喷上溴酚蓝显色剂。在有柠檬酸等有机酸处即可出现黄色斑点，与标准柠檬酸斑点比较，观察柠檬酸结晶是否纯净。

## 四、蛋白质化学

### 11. 人发中提取胱氨酸

#### 一、目的

学习用酸水解蛋白质的方法来提取氨基酸；了解等电点意义及其应用价值。

#### 二、原理

蛋白质是由多种氨基酸通过肽键连接而成的多肽化合物，若用酸、碱或酶处理，可以使肽键水解，如果肽键彻底水解则可得组成这蛋白质的各种氨基酸。某些蛋白质含有某种氨基酸特别丰富，就可采用这种蛋白质为材料，进行水解，再根据氨基酸理化性质上的特点，用简易方法分离，获得较纯净的氨基酸。本实验采用含胱氨酸丰富的头发为材料，进行酸水解。然后利用在等电点时氨基酸溶解度最小的原理，调节水解液达胱氨酸等电点时的 pH 值 4.8，使胱氨酸自水解液中沉淀出来，经过滤去除废液，即可获得胱氨酸粗结晶。

#### 三、实验材料，仪器和试剂

##### 1. 实验材料

人发；滤纸；精密试纸 pH 3.8~5.4。

##### 2. 仪器

圆底烧瓶 500 毫升(×1)；冷凝管(×1)；长玻管(×1)；漏斗 9 厘米(×1)；烧杯 400 毫升(×1)，100 毫升(×1)；吸滤瓶 250 毫升(×1)；布氏漏斗 5 厘米(×1)；玻棒；滴管。



### 3. 试剂

浓盐酸; 浓氨水; 1N 盐酸; 75% 乙醇溶液; 活性炭。

## 四、操作步骤

### 1. 洗发

用热肥皂水洗去头发油垢, 再用清水洗净并干燥之。

### 2. 水解

按图 4 装置仪器, 在左面烧杯中注入水, 注意漏斗要恰好

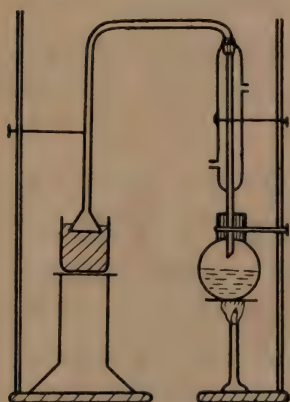


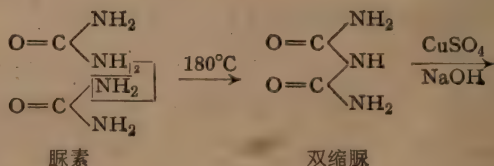
图 4 人发水解仪器装置图

接触水面, 但又不可浸入太深, 以免杯中的水吸至烧瓶中。称取头发 10 克和 30 毫升浓盐酸于烧瓶中, 然后回流加热 2 小时。取少量水解液, 中和后以双缩脲反应\*检验蛋白质, 直到此反应呈阴性, 表示水解已完全。

### 3. 粗结晶

水解完全后, 打开瓶塞, 加入等体积水, 继续加热, 使蒸发至原体积的 1/3。将此水解液用布氏漏斗吸滤, 去除残渣, 滤液呈棕

\* 将脲素加热, 二分子脲素放出一分子氨缩合成双缩脲。双缩脲在碱性溶液中与硫酸铜生成粉红色化合物, 此称双缩脲反应。蛋白质含有二个以上的肽键, 故有此反应。



色。加 1 克活性炭，加热 10 分钟脱色、过滤，滤液呈浅黄色，根据脱色情况，可脱色 1~2 次。在通风柜中用浓氨水调节 pH 达 4.8 左右(注意 pH 切勿调过头)，即可观察到白色沉淀产生，放冰箱过夜，使沉淀完全，次日用布氏漏斗过滤得到胱氨酸粗结晶。

#### 4. 重结晶

将粗结晶溶于 1N 盐酸中(约 15 毫升左右)，加活性炭 1 克，小火加热煮沸 10 分钟脱色，滤液呈无色透明，再用浓氨水调 pH 至 4.8，白色结晶很快析出，待结晶完全后用布氏漏斗吸滤，结晶用少量蒸馏水洗涤，再用 75% 乙醇洗涤一次，抽气吸干后放 50°C 烘箱内干燥。

#### 5. 纯度鉴定

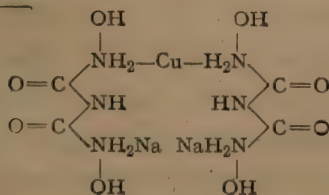
胱氨酸的纯度鉴定可采用纸上层析法分析纯度；也可测其熔点 258~261°C；元素分析 H 为 11.66%，S 为 26.65%。

## 12. 面粉中赖氨酸含量测定<sup>[4]</sup>

### 一、目的

学习用三硝基苯磺酸法测定蛋白质中赖氨酸的含量。

### 二、原理

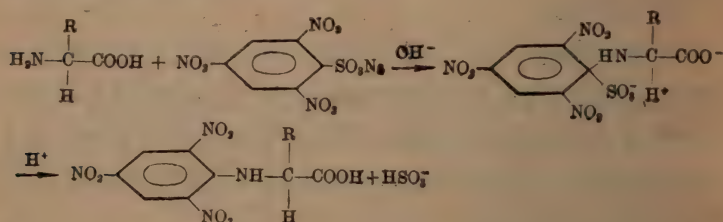


红色化合物

蛋白水解程度鉴定：取水解液 4~5 滴，加少量蒸馏水稀释，加 10% 氢氧化钠 0.5 毫升，再沿管壁加入 1% 硫酸铜数滴，观察有否红色反应产生，如出现阴性表示水解完全。

赖氨酸是必需氨基酸之一，在谷物的蛋白质中，赖氨酸含量的高低与谷物的质量有密切关系。

三硝基苯磺酸 (TNBS) 是定量测定氨基酸的重要试剂之一。TNBS 在偏碱性的条件下与氨基酸反应，先形成一中间络合物，如下式所示：



中间络合物在光谱上有二个吸收值相近的高峰，分别位于 355 毫微米和 420 毫微米附近。然而溶液一旦酸化后，中间络合物都转化成三硝基苯-氨基酸 (TNP-氨基酸)，在 420 毫微米处的吸收峰值显著下降，在 355 毫微米附近的吸收峰则移至 340 毫微米处。利用 TNBS 与氨基酸反应这一特性，可在 420 毫微米处 (偏碱性溶液中) 或在 340 毫微米 (偏酸性溶液中) 对氨基酸进行定量测定。

由于三硝基苯磺酸只与蛋白质中 N-末端的  $\alpha$ -氨基及赖氨酸残基的  $\epsilon$ -氨基起反应，反应后所生成的 TNP-蛋白质经部分酸水解后，分别产生含有  $\alpha$ -TNP-氨基及  $\epsilon$ -TNP-氨基的小肽碎片。在酸性溶液中前者可用有机溶剂抽提除去，而酸溶液中留下的  $\epsilon$ -TNP-氨基含量即可在 340 毫微米处定量测定，此含量即相当于蛋白质中赖氨酸的含量。

赖氨酸的标准溶液应该用  $\epsilon$ -TNP-赖氨酸。在  $\epsilon$ -TNP-赖氨酸来源困难时，由于不同种类的 TNP-氨基酸在 340 毫微米处的吸收值一致，可以用其他氨基酸代替。本实验用丙氨酸

代替。

### 三、实验材料, 仪器和试剂

#### 1. 实验材料

面粉; 丙氨酸。

#### 2. 仪器

吸管 1 毫升( $\times 6$ ), 2 毫升( $\times 2$ ), 5 毫升( $\times 2$ ), 10 毫升( $\times 2$ ); 试管  $1.5 \times 15$  厘米( $\times 11$ ); 分液漏斗 25 毫升( $\times 1$ ); 烘箱; 电热恒温水浴箱; 离心机; 751 型分光光度计。

#### 3. 试剂

4% 碳酸氢钠溶液: 4 克碳酸氢钠加蒸馏水至 100 毫升。

50% 和 5% 三氯乙酸溶液: 称取 50 克和 5 克三氯乙酸各一份, 用蒸馏水分别定容至 100 毫升。

0.1% 三硝基苯磺酸溶液: 0.1 克三硝基苯磺酸加蒸馏水至 100 毫升, 贮于棕色瓶中。

6*N* 盐酸溶液; 1*N* 盐酸溶液; 丙酮(化学纯); 乙醚(化学纯)。

### 四、操作步骤

#### 1. 标准曲线制作

精确称取丙氨酸 2.85 克溶解在 100 毫升水中, 使成 0.5 *mM* 水溶液。

取五支试管, 按表配制各管和进行操作, 最后在 340 毫微米测定光密度值(以蒸馏水作空白)。

以丙氨酸微克分子数(即相当于赖氨酸微克分子数)为横座标, *OD* 值为纵座标绘制标准曲线。

#### 2. 面粉中赖氨酸含量的测定

面粉用过量 20 倍的丙酮脱脂二次, 再用乙醚处理并干燥之。



管号	丙氨酸 (微克分子)	0.5mM 丙氨酸 (毫升)	水 (毫升)	4% 碳酸氢钠 (毫升)	0.1%TNBS (毫升)	40 °C 保温 2 小时	1N 盐酸 (毫升)	OD <sub>340</sub>
1	0.05	0.1	0.9	1	1		1	
2	0.1	0.2	0.8	1	1		1	
3	0.2	0.4	0.6	1	1		1	
4	0.3	0.6	0.4	1	1		1	
5	0.4	0.8	0.2	1	1		1	

取脱脂面粉 0.200 克于试管内，加 2 毫升 4% 碳酸氢钠，不断用玻棒搅拌抽提数小时，离心后用 2 毫升 4% 碳酸氢钠抽提三次，合并抽提液，加 5 毫克左右固体三硝基苯磺酸，于 40°C 保温 2 小时。反应后用 50% 三氯乙酸酸化，使 TNP-蛋白质沉淀完全。离心去上清液，沉淀用 5% 三氯乙酸洗涤五次，丙酮洗涤五次，倾去洗涤液，干燥后得 TNP-蛋白质。

在 TNP-蛋白质中加入 6N 盐酸 2.5 毫升，封口，于 110°C 水解 2 小时。开启水解管，取水解液 2 毫升，置分液漏斗中加蒸馏水 10 毫升，用 8 毫升乙醚抽提 4~5 次。取水相在 60°C 水浴中略保温，以除去乙醚，最后取其 3 毫升(重复 2~3 份)加蒸馏水 1 毫升，在 340 毫微米测光密度值(以水作为空白)。

### 五、结果计算

将样品测得的光密度值从标准曲线上查得相当 A 微克分子氨基酸，计算至每克脱脂面粉中碱可溶性蛋白质中的赖氨酸含量为：

$$\text{赖氨酸含量(毫克/克脱脂面粉)} = \frac{A \times 12 \times 2.5 \times 145.2}{3 \times 2 \times 0.2 \times 1000}$$

式中 145.2 为赖氨酸分子量。

### 13. 氨基酸双向纸层析<sup>[5]</sup>

#### 一、目的

学习双向纸层析法的原理和操作方法，进行混合氨基酸的分离分析。

#### 二、原理

纸层析是以滤纸作支持物，用一定的溶剂系统展开，使混合样品达到分离分析的层析方法。此法常用来进行生物化学物质的定性、定量、分离制备工作。

纸层析法的一般操作是将样品溶解在适当溶剂(水、缓冲液或有机溶剂)中，点样在滤纸的一端，再选用适当的溶剂系统，从点样的一端通过毛细现象向另一端展开。展开完毕，取出滤纸凉干或烘干，再以适当的显色剂或在紫外灯、荧光灯下观察纸层析图谱。样品经展层后某一物质在纸层析谱上的位置常用比移值  $R_f$  来表示：

$$R_f = \frac{\text{原点至层析斑点中心的距离}}{\text{原点至溶剂前沿的距离}}$$

纸层析可以看作是溶质(样品)在固定相与流动相之间的连续抽提，由于溶质在两相间的分配系数不同而达到分离。一定的物质在两相之间有固定的分配系数，在恒定的条件(如层析溶剂、pH、展层温度等)下，各物质在纸层析谱上有固定的比移值，借此可以达到分析鉴定目的。

由于滤纸纤维常能吸收 20~25% 的水分，而且其中 6~7% 的水是以氢键形式与纤维素上的羟基结合，在一般条件下较难脱去，所以一般的纸层析实际上是以水作固定相，展开的溶剂作为流动相，以达到分配层析的目的。

纸层析操作按溶剂展开方向可分为上行、下行、径向三种。氨基酸分离一般采用上行法。上行法中又可分为单向和双向，对一般成分较为简单的样品单向展开即能达到分离目的。成分较为复杂的样品由于在单向层析中某些物质的斑点相互重叠分离不开，必须采用双相层析，即先以一种溶剂系统展开后，再以另一种性质相异的溶剂系统在其垂直方向作第二次展开，如此获得的双向层析谱可以分离鉴别十几种或更多种的氨基酸或其他样品。

一般层析用滤纸要求：

(1) 质地均匀，平整无折痕，厚薄适当，使溶剂以适宜的速度均匀展开。

(2) 机械强度好，使溶剂展开后滤纸保持原状，不致折倒。

(3) 滤纸有一定纯度，杂质要少，以免影响层析图谱出现杂质斑点或背景不清楚等现象。

(4) 滤纸纤维松紧适宜，太松易使分离物质扩散，太紧则延长展层时间，一般选择中速滤纸，或根据溶剂来选择。如丁醇类溶剂粘度大展开速度慢用快速滤纸较好，而石油醚、氯仿展开速度快，则采用慢速滤纸。

在定性鉴定时常采用较薄的滤纸，制备时选用厚质滤纸。

要选择适当的溶剂，使获得满意的层析图谱。一个理想的溶剂应满足如下条件：

(1) 被分离物质在该溶剂系统中比移值  $R_f$  在 0.05~0.8 之间，二个被分离物质的  $R_f$  值相差最好大于 0.05，以免斑点重叠。

(2) 溶剂系统中的每一组成分与分离物质之间不起化学反应。

(3) 分离物质在溶剂系统中的分配比较恒定, 不随温度变化而改变, 而且容易迅速达到平衡, 这样获得的斑点较圆整。

本实验采用八种混合氨基酸溶液为实验材料, 用酸性和碱性两种溶剂进行双向层析, 并用茚三酮溶液作为氨基酸层析图谱的显色剂, 可以获得分离清晰的层析图谱。

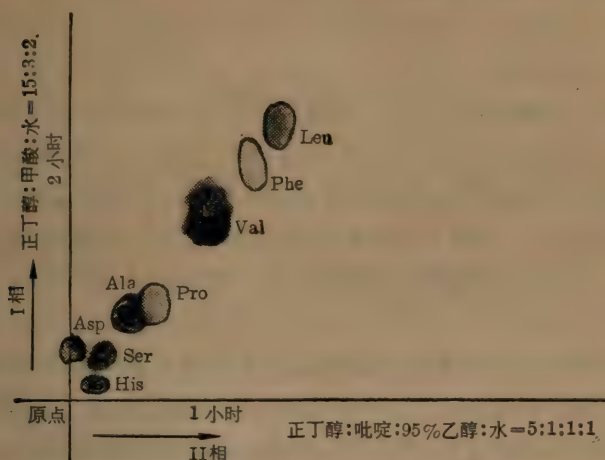


图 5 氨基酸双向纸层析图谱

### 三、实验材料, 仪器和试剂

#### 1. 实验材料

标准氨基酸混合溶液: 亮氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丙氨酸、天门冬氨酸、组氨酸、丝氨酸各 1 毫克溶解于 0.5 毫升 0.01 N 盐酸中。

新华层析滤纸 15 × 11 厘米; 铅笔; 尺。

#### 2. 仪器



层析缸 25×40 厘米(×2); 培养皿 15 厘米直径(×2); 喷雾器; 毛细管 0.1 厘米内径; 电吹风; 烘箱。

### 3. 试剂

0.1% (W/V) 茚三酮丙酮溶液。

溶剂系统: 第一相, 正丁醇:88% 甲酸:水 = 15:3:2 (V/V); 第二相, 正丁醇:吡啶:95% 乙醇:水 = 5:1:1:1 (V/V)。

## 四、操作步骤

### 1. 点样

取层析滤纸一张(15×11 厘米), 在距纸边 1.2 厘米处划一基线, 再将纸转 90 度, 距纸边 1.2 厘米处作一垂直线, 用 0.1 厘米粗的毛细管吸取混合氨基酸溶液, 点在二线交点上(见图 5), 点子的直径控制在 2 毫米左右, 待样品干燥后, 再重复点一次。滤纸上点样斑点干燥后, 把滤纸卷成圆筒形, 纸的二边用铬丝连接但不要重迭。

### 2. 展开

在 25×40 厘米的层析缸中放入一装有第一相层析溶剂的培养皿, 要求放平稳。将点好样并卷成圆筒形的滤纸放入缸内, 使点样一端接触溶剂, 但点样处不能浸入溶剂中, 让溶剂自下而上均匀展开, 约 2 小时后溶剂前沿达到距纸边 0.5 厘米时取出滤纸, 悬挂在室温中, 用电吹风充分吹尽溶剂, 并将未走过溶剂的滤纸边裁去。再把滤纸转 90 度方向, 卷成圆筒状, 放入盛第二相溶剂的层析缸内进行展开, 约 1 小时后溶剂展开到距纸边 0.5 厘米时取出, 电吹风吹尽溶剂, 滤纸干燥。

### 3. 显色

用喷雾器将茚三酮溶液均匀喷雾在纸上, 滤纸悬挂在 65°C 的烘箱内, 加热 20 分钟左右即可看到紫红色的氨基酸斑点, 层析图谱上的斑点用铅笔圈出。

## 五、注意点

(1) 在喷雾茚三酮溶液后, 烘箱加热温度不宜过高, 并要求避免氨的干扰, 否则会使纸层析图谱的背景泛红。

(2) 溶剂中所用的正丁醇需要重新处理, 可用氯化钙干燥后重蒸 1~2 次, 收集沸点 117~118°C 部分; 甲酸、乙醇、吡啶等都要用分析纯试剂。

(3) 第一相溶剂最好在使用前才按比例混合, 否则过早混合在一起会引起酯化, 影响层析结果。

## 14. 氨基酸纤维素薄层层析

### 一、目的

学习纤维素薄层层析的操作方法, 掌握分配层析的原理。

### 二、原理

以纤维素作为支持物, 把它均匀地涂布在玻板上成一薄层, 然后在此薄层上进行层析即为纤维素薄层层析。纤维素是一种隋性支持物, 它与水有较强的亲和力而与有机溶剂亲和力较弱。层析时吸着在纤维素上的水是固定相, 而展层溶剂是流动相。当欲被分离的各种物质在固定相和流动相中的分配系数不同时, 它们就能被分离开。

### 三、实验材料, 仪器和试剂

#### 1. 实验材料

标准氨基酸溶液: 丙氨酸、酪氨酸、脯氨酸、组氨酸以及四种氨基酸的混合样品分别以 0.01N 盐酸配成 4 毫克/毫升的溶液。

纤维素粉 (层析用, Serva) 或微晶型纤维素 (层析用, 上海试剂四厂或 E.M. K.)。羧甲基纤维素钠 (上海长虹塑料厂)。

## 2. 仪器

烧杯 50 毫升( $\times 1$ ); 玻璃板  $10 \times 20$  厘米( $\times 1$ ); 层析缸  $22 \times 22$  厘米; 毛细管 0.5 毫米直径; 喷雾器; 研钵; 玻棒。

## 3. 试剂

层析溶剂系统: 正丁醇(分析纯): 醋酸(分析纯): 水 = 4: 1: 5(V/V)。

显色剂: 0.1% 茚三酮丙酮溶液。

## 四、操作步骤

### 1. 制板

取少量羧甲基纤维素钠(约 12 毫克), 加数毫升水在烧杯中搅动, 使羧甲基纤维素钠溶解。称取纤维素粉或微晶型纤维素 2 克放入此烧杯内并把水补足到 12 毫升, 充分搅匀(若是微晶型纤维素则要放在研钵中研磨均匀), 把纤维素浆倒在洗净烘干的玻璃板上, 倾斜玻板同时轻轻拍动此板, 使纤维素均匀分布在玻板上, 薄层厚度约 0.5 毫米。水平放置片刻后放入  $100 \sim 110^\circ\text{C}$  烘箱中, 烘三十分钟。干燥的纤维素薄板贮存于干燥器内备用。

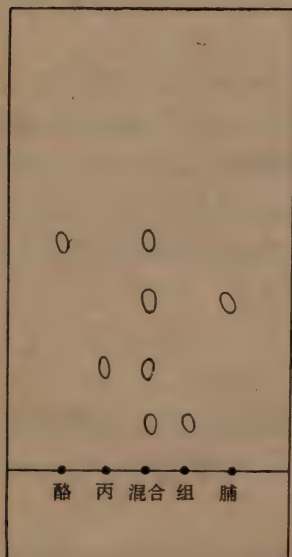


图 6 氨基酸纤维素薄层  
层析示意图谱

此处羧甲基纤维素钠是起粘合剂作用, 它使纤维素粉能较牢固地粘附于玻璃板上。加入量过多破坏纤维素薄层的毛细作用而使层析速度延缓; 加的量过少则粘合不牢固, 因此须加注意。

## 2. 点样

在纤维素薄板上距一端 15 毫米处，用铅笔每隔 15 毫米作一记号，共五点。用 0.5 毫米直径的毛细管吸取样品，按图分别点样一次，样品点子直径控制在 2 毫米左右（不超过 3 毫米）。

## 3. 展开

将薄板有样品的一端浸入已存放溶剂的层析缸中，层析溶剂液面不能高于样品线。待展层溶剂走到距薄板顶端 0.5~1 厘米处时取出此薄板（约 1~2 小时），用铅笔在溶剂前沿处作一记号后放在 100°C 烘箱中烘干。

## 4. 显色

将茚三酮显色剂喷雾在板上，再在 65°C 烘箱中烘数分钟，即可观察到紫红色的氨基酸斑点，其中脯氨酸例外，它的斑点呈黄色。用铅笔圈出氨基酸斑点，并计算各氨基酸的  $R_f$  值。

# 15. 缓冲液的性质

## 一、目的

通过本实验了解缓冲液的特性。

## 二、原理

由弱酸和弱酸盐配成的溶液具有一种性能，即当外加少量酸或碱后，溶液能保持原酸度不变，这一作用称为缓冲作用。缓冲溶液的酸度即 pH 值，主要取决于弱酸的电离常数，同时当弱酸和弱酸盐的比例变化时，溶液的 pH 也会变化。

设弱酸的电离平衡常数为  $K$ ，平衡时弱酸的浓度为  $[\text{酸}]$ ，弱酸盐的浓度为  $[\text{盐}]$ ，则由弱酸的电离平衡得到下式：

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{[\text{盐}]}{[\text{酸}]}$$



根据上式可得以下几点结论:

(1) 缓冲溶液的 pH 值与该酸的电离常数  $K$  及盐和酸的浓度有关。弱酸一定,但酸和盐的比例不同时,可以得到不同的 pH 值。当酸和盐浓度相等时,溶液的 pH 值与  $pK$  值相同。

(2) 酸和盐的浓度等比例地增减时,溶液的 pH 值不变。

(3) 酸和盐浓度相等时,缓冲液的缓冲效率为最高。比例相差越大,缓冲效率越低。

### 三、实验材料,仪器和试剂

#### 1. 实验材料

醋酸和醋酸钠组成的缓冲液。

#### 2. 仪器

吸管 10 毫升( $\times 3$ ); 试管  $1.5 \times 15$  厘米( $\times 24$ ); 烧杯 100 毫升( $\times 1$ ); 量筒 100 毫升( $\times 1$ ); 滴管。

#### 3. 试剂

0.1N 醋酸钠 (NaAC); 0.1N 醋酸 (HAC); 0.1N 盐酸;  
0.1N 氢氧化钠。

溴甲酚绿(简称 B.C.G 指示剂): 指示范围  $pH 3.8 \sim 5.4$  由黄色到蓝色。配法见附录 9。

溴酚蓝(简称 B.P.B 指示剂): 指示范围  $pH 3.0 \sim 4.6$  由黄色变为紫色。配法见附录 9。

### 四、操作步骤

#### 1. 缓冲溶液的配制和指示剂的有效指示范围

按下表配制一套缓冲溶液的标准管,作为本实验比色之用。

管号	0.1N NaAC (毫升)	0.1N HAC (毫升)	B.C.G (滴)	pH (18°C)	观察颜色
1	0.75	9.25	10	3.6	
2	1.20	8.80	10	3.8	
3	1.80	8.20	10	4.0	
4	2.65	7.35	10	4.2	
5	3.70	6.30	10	4.4	
6	4.9	5.10	10	4.6	
7	5.9	4.10	10	4.8	
8	7.00	3.00	10	5.0	
9	7.90	2.10	10	5.2	

结论：说明溴甲酚绿指示剂的指示范围从 pH3.6~5.2 都能清晰反映出来。

## 2. 缓冲溶液的缓冲作用

在烧杯中放入 100 毫升的蒸馏水，加入 0.1N HAC 数滴使 pH 调至 4.6，作为下表中的酸水，按下表配制各管。

管号	酸水 (毫升)	0.1N NaAC (毫升)	0.1N HAC (毫升)	B.C.G (滴)	观察 pH	0.1N HCl (滴)	0.1N NaOH (滴)	观察 pH
10	10	—	—	10		—	—	
11	10	—	—	10		1	—	
12	10	—	—	10		—	1	
13	—	4.90	5.10	10		1	—	
14	—	4.90	5.10	10		—	1	

将各管和前一表中的管 1~管 9 相比较，并估计各管的 pH 值，分别填入表中。从实验中观察到，加入等量的酸或碱

会使酸水的 pH 很快发生变化，但对缓冲液的 pH 值影响甚微。说明缓冲溶液能忍受外加的酸和碱，而不使 pH 变化。

### 3. 稀释对缓冲液 pH 的影响

管号	稀释倍数	0.1N NaAC (毫升)	0.1N HAC (毫升)	H <sub>2</sub> O (毫升)	B.C.G (滴)	观察 pH	0.1N HCl (滴)	0.1N NaOH (滴)	观察 pH
15	1	2.45	2.55	5.0	10		1	—	
16	1	2.45	2.55	5.0	10		—	1	
17	5	0.98	1.02	8.0	10		1	—	
18	5	0.98	1.02	8.0	10		—	1	

按上表配置后与管 6 比较其 pH，说明缓冲溶液经稀释 5 倍后，pH 值不变，并仍有缓冲作用。

### 4. 缓冲效率

按下表配制三种不同 pH 的缓冲液，用 B.C.G 和 B.P.B 为指示剂，然后逐渐加入少量的酸，并随时观察那一种 pH 缓冲液的缓冲效率大。

管号	pH	0.1N NaAC (毫升)	0.1N HAC (毫升)	B.C.G (滴)	B.P.B (滴)	0.1N HCl (滴)
19	4.6	2.45	2.55	10		1
20	4.6	2.45	2.55	10		
21	4.0	0.90	4.10		8	1
22	4.0	0.90	4.10		8	
23	3.6	0.38	4.62		8	1
24	3.6	0.38	4.62		8	

管号	蒸馏水 (滴)	观察 pH 有无变化	0.1N HCl (滴)	蒸馏水 (滴)	共用几滴 HCl 使 pH 发生变化
19			1		
20	1			1	
21			1		
22	1			1	
23			1		
24	1			1	

从实验结果可观察到管 19 的缓冲效率大于管 21，而管 21 又大于管 23，说明缓冲液的 pH 值愈接近于所用酸的 pK 值者缓冲效率愈大。

## 16. 蛋白质的电荷

### 一、目的

通过本实验，证明蛋白质在较它的等电点的 pH 值更小或更大溶液中时带有不同的电荷。说明蛋白质具有两性特征。

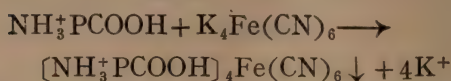
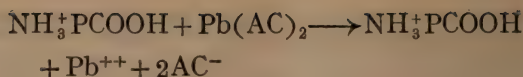
### 二、原理

在较等电点的 pH 值低的溶液中，蛋白质带阳电荷，因此能和阴离子化合为盐。在较等电点的 pH 值高的溶液中，蛋白质带阴电荷，因此能和阳离子化合为盐。蛋白质的某些盐不溶于水，例如蛋白的铅盐和蛋白质的亚铁氰酸盐，都是不溶于水的。本实验利用这类盐的生成，来测定在不同 pH 值的溶液中所负的电荷性质。其化学反应式表示如下：

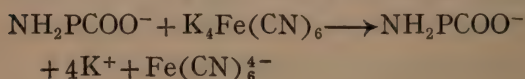
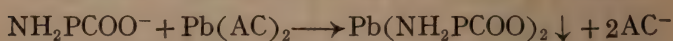
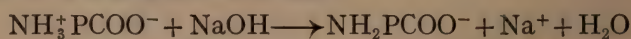
(1) 在较等电点为酸的溶液里，蛋白质只和亚铁氰化钾生成沉淀，而与醋酸铅不起反应。







(2) 在较等电点为碱的溶液里，蛋白质只和醋酸铅生成沉淀，而与亚铁氰化钾不起反应。



### 三、仪器和试剂

#### 1. 实验材料

0.5% 卵清蛋白。

#### 2. 仪器

试管 1.5 × 15 厘米(×4); 吸管 2 毫升(×1); 滴管(×4)。

#### 3. 试剂

0.5% 卵清蛋白; 0.5N 盐酸; 0.5N 氢氧化钠; 10% 醋酸铅; 1% 亚铁氰化钾。

### 四、操作步骤

取 4 支试管按下表配制:

管号	卵清蛋白 (毫升)	0.5N NaOH	0.5N HCl	10% Pb(AC) <sub>2</sub>	1% K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	结果
1	2	1滴	—	1滴	—	
2	2	1滴	—	—	1滴	
3	2	—	1滴	1滴	—	
4	2	—	1滴	—	1滴	

从实验可知蛋白质在比其等电点偏酸的溶液中，以阳离子形式存在；在比其等电点偏碱的溶液中，以阴离子形式存在。

## 17. 蛋白质等电点测定

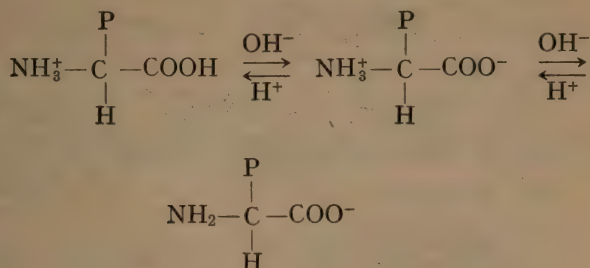
### 一、目的

了解等电点的意义及其与蛋白质分子聚沉能力的关系。

### 二、原理

蛋白质的分子量很大，它能形成稳定均一的溶液，主要是由于蛋白质分子都带有相同符号的电荷，同时蛋白质分子周围有一层溶剂化的水膜，避免蛋白质分子之间聚集而沉降。

蛋白质分子所带的电荷与溶液的 pH 值有很大关系，蛋白质是两性电解质，在酸性溶液中成阳离子，在硷性溶液中成阴离子：



蛋白质分子所带净电荷为零时的 pH 值称为蛋白质的等电点(IP)。在等电点时，蛋白质分子在电场中不向任何一极移动，而且分子与分子间因碰撞而引起聚沉的倾向增加，所以这时可以使蛋白质溶液的粘度、渗透压均减到最低，且溶液变混浊。若再加入一定量的溶剂如乙醇、丙酮，它们与蛋白质分子争夺水分子，竭力减低蛋白质水化层的厚度而使混浊更加明显。

各种蛋白质的等电点都不相同,但偏酸性的较多,如牛乳蛋白的等电点是 4.7~4.8, 血红蛋白等电点为 6.7~6.8, 胰岛素是 5.3~5.4, 鱼精蛋白是一个典型的硷性蛋白, 其等电点在 pH12.0~12.4。近年来蛋白质的等电点可以采用等电聚焦技术加以准确测定,但需一定的实验条件。本实验采用蛋白质在不同 pH 溶液中形成的混浊度来确定, 即混浊度最大时的 pH 值即为该种蛋白质的等电点值, 这个方法虽然不很准确,但在一般实验条件下都能进行,操作也简便。

### 三、实验材料, 仪器和试剂

#### 1. 实验材料

酪蛋白。

#### 2. 仪器

试管 1.5×15 厘米(×9); 吸管 1 毫升(×2), 2 毫升(×2), 10 毫升(×2); 容量瓶 50 毫升(×2), 500 毫升(×1); 试管架。

#### 3. 试剂

0.01N 醋酸溶液, 0.1N 醋酸溶液, 1N 醋酸溶液; 1N 氢氧化钠溶液(氢氧化钠和醋酸溶液的浓度要标定)。

### 四、操作步骤

#### 1. 制备蛋白质胶液

(1) 称取酪蛋白 3 克, 放在烧杯中, 加入 40℃ 的蒸馏水。

(2) 加入 50 毫升 1N 氢氧化钠溶液, 微热搅拌直到蛋白质完全溶解为止。将溶解好的蛋白溶液转移到 500 毫升容量瓶中, 并用少量蒸馏水洗净烧杯, 一并倒入容量瓶。

(3) 在容量瓶中再加入 1N 醋酸溶液 50 毫升, 摇匀。

(4) 加入蒸馏水定容至 500 毫升, 得到略现浑浊的, 在 0.1N NaAC 溶液中的酪蛋白胶体。

#### 2. 等电点测定

按下表次序在各管中加入蛋白质胶液，并准确地加入蒸馏水和各种浓度的醋酸溶液，加入后立即摇匀。

管号	蛋白质胶液 (毫升)	H <sub>2</sub> O (毫升)	0.01N HAC (毫升)	0.1N HAC (毫升)	1N HAC (毫升)	pH	观 察		
							0分钟	10分钟	20分钟
1	1	8.38	0.62	—	—	5.9			
2	1	7.75	1.25	—	—	5.6			
3	1	8.75	—	0.25	—	5.3			
4	1	8.50	—	0.50	—	5.0			
5	1	8.00	—	1.00	—	4.7			
6	1	7.00	—	2.00	—	4.4			
7	1	5.00	—	4.00	—	4.1			
8	1	1.00	—	8.00	—	3.8			
9	1	7.4	—	—	1.60	3.5			

观察各管产生的混浊并根据混浊度来判断酪蛋白的等电点。观察时可用 +, ++, +++, 表示浑浊度。

## 18. 总氮测定(一)——常量克氏定氮法

### 一、目的

采用常量克氏定氮法测定生物材料的含氮量。

### 二、原理

测定有机物中的含氮量，通常是设法使其转变成无机含氮物后再加以测定。本实验将有机物与浓硫酸一起加热消化，待消化完毕后，有机氮形成铵盐，再加碱，使氮游离，经蒸馏逸出的氮为定量的标准酸所吸收，然后以标准碱液滴定剩余的



酸。从标准碱液的消耗量,求出含氮量。

### 三、实验材料,仪器和试剂

#### 1. 实验材料

干酵母;沸石。

#### 2. 仪器

克氏烧瓶 100~200 毫升( $\times 3$ );三角烧瓶 150 毫升( $\times 3$ );滴定管(酸式和碱式各一支);量筒 100 毫升( $\times 2$ );天平。

#### 3. 试剂

浓硫酸;45%氢氧化钠;0.1*N*标准盐酸溶液;0.1*N*标准氢氧化钠溶液。

指示剂:0.1%甲基红乙醇溶液。

催化剂:硫酸铜:硫酸钾=1:4(W/W),研成细末备用。

### 四、操作步骤

#### 1. 消化

精确称取干酵母0.5~1克(其重量以含蛋白质多少而定)三份,分别放在150毫升克氏烧瓶底部,加浓硫酸10~15毫升,催化剂1克,瓶口插一玻璃漏斗,放在通风柜中进行加热消化,温度不宜过高,只要保持瓶内微沸腾状态,至瓶内成透明或带蓝色的透明液时,即表示消化完毕。

#### 2. 蒸馏

取150毫升三角瓶三只,自滴定管中精确地放入0.1*N*标准盐酸溶液25毫升,和2滴甲基红指示剂。然后按图7装置仪器。盛有标准酸的三角瓶接在冷凝管下,冷凝器的导管必须插入酸溶液中。已消化好的克氏瓶冷却后,加蒸馏水50毫升及红色石蕊纸一张,再沿瓶颈加入40~50毫升45%氢氧化钠,碱的量以石蕊试纸刚变蓝色为准,再加入几块沸石,连接各部装置,并检查有否漏气,加热蒸馏,到馏出液不呈碱

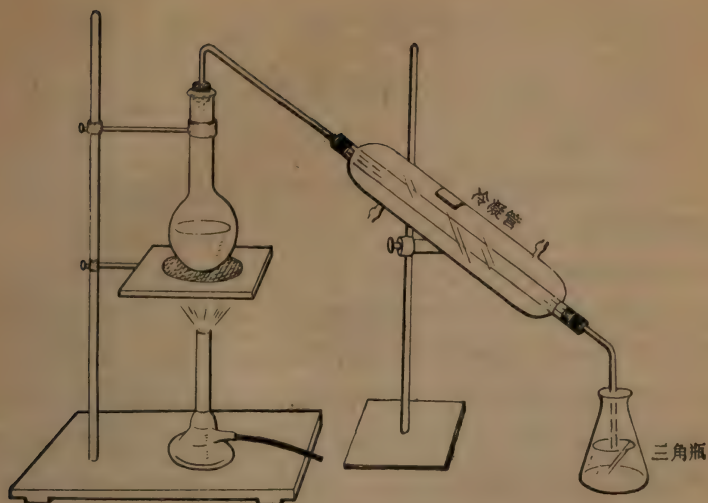


图 7 常量定氮蒸馏装置

性为止(以石蕊试纸检验),取下三角瓶,并冲洗冷凝器导管。

### 3. 滴定

蒸馏完毕后,取下三角瓶,加二滴甲基红指示剂,用0.1N氢氧化钠溶液滴定至终点。

## 五、结果计算

$$\text{总氮量}\% = \frac{(N_1 V_1 - N_2 V_2) \times \frac{14}{1000}}{\text{样品重(克)}} \times 100\%$$

式中:  $N_1$  为盐酸当量浓度,

$V_1$  为盐酸的毫升数,

$N_2$  为氢氧化钠当量浓度,

$V_2$  为氢氧化钠消耗毫升数。

## 19. 总 氮 测 定(二)

### ——微量克氏定氮法<sup>[5,6]</sup>

#### 一、目的

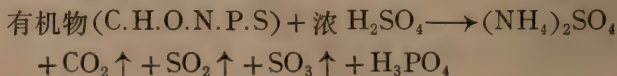
学习用微量克氏(Micro-Kjeldahl)定氮法来测定生物材料的总氮量。

#### 二、原理

生物材料中含有许多含氮化合物,如蛋白质、核酸、氨基酸等。对其含氮量的测定在生物化学研究中具有一定的意义,例如已知蛋白质含氮量通常在16%,因此只要测出蛋白质样品的含氮量,再乘6.25即可知道蛋白质量。又如核酸中的氮磷比值(N/P)通常是一定的,如果提取的核酸样品含有蛋白质杂质,则N/P比值就增高,它是说明核酸纯度的指标之一。生物材料总氮量的测定,通常采用微量克氏定氮法,它适用于测定0.2~2.0毫克的氮。其方法原理如下:

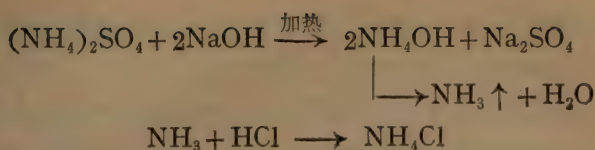
##### 1. 消化

有机物与浓硫酸共热,使有机氮全部转变为无机氮(硫酸铵)。由于消化过程进行缓慢,在实验中常添加硫酸铜和硫酸钾的混合物来促进,硫酸铜是催化剂,硫酸钾可提高硫酸的沸点。消化所需时间视样品性质而定,一般在30分钟至1小时左右。消化时化学反应如下:



##### 2. 加碱蒸馏

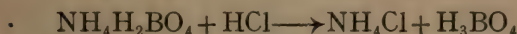
消化得到的硫酸铵与浓氢氧化钠作用生成氢氧化铵,加热后得到氨。氨通过蒸馏导入过量的标准酸中被吸收。



### 3. 滴定

用过量的标准盐酸吸收氨，其剩余的酸可用标准氢氧化钠滴定，由所用盐酸当量数减去滴定所耗氢氧化钠的当量数，即为被吸收的氨当量数。此法称回滴法，采用甲基红作指示剂。 $\text{HCl} + \text{NaOH} \longrightarrow \text{NaCl} + \text{H}_2\text{O}$ 。

在实验中也可采用硼酸溶液作为氨的吸收液，硼酸吸收氨后，使硼酸溶液的氢离子浓度降低，这时混合指示剂（pH 4.3~5.4）由黑紫色变为绿色。再用标准酸来滴定，使硼酸溶液恢复到原来的氢离子浓度为止，指示剂出现淡紫红色为终点。这时所耗的盐酸当量即为氨的当量，此法称直接法，只需配制酸的标准液。



## 三、实验材料, 仪器和试剂

### 1. 实验材料

豆腐废水(豆制品厂废液)。

### 2. 仪器

微量定氮仪(一套); 胖肚吸管 25 毫升( $\times 1$ ); 吸管 1 毫升( $\times 3$ ), 2 毫升( $\times 1$ ); 酸或碱式滴定管 25 毫升( $\times 1$ ); 烧杯 200 毫升( $\times 2$ ); 量筒 10 毫升( $\times 1$ ); 三角烧瓶 150 毫升( $\times 4$ ); 消化管 30 毫升( $\times 6$ ); 吸耳球( $\times 1$ ); 消化炉。

### 3. 试剂

浓硫酸(C.P.); 30% 过氧化氢; 10N 氢氧化钠; 0.01N 盐



酸标准溶液; 0.01*N* 氢氧化钠标准溶液; 3% 硼酸溶液。

指示剂: 0.1% 甲基红乙醇溶液。

混合指示剂: 由 5 体积 0.2% 溴甲酚绿乙醇溶液和 1 体积 0.2% 甲基红乙醇溶液混合而成。

催化剂: 硫酸铜: 硫酸钾 = 1:4(W/W) 混合, 研成细末备用。

0.6 毫克/毫升硫酸铵溶液: 准确称取 2.829 克硫酸铵加水定容至 1 升。

#### 四、操作步骤

##### 1. 仪器的装置和清洗

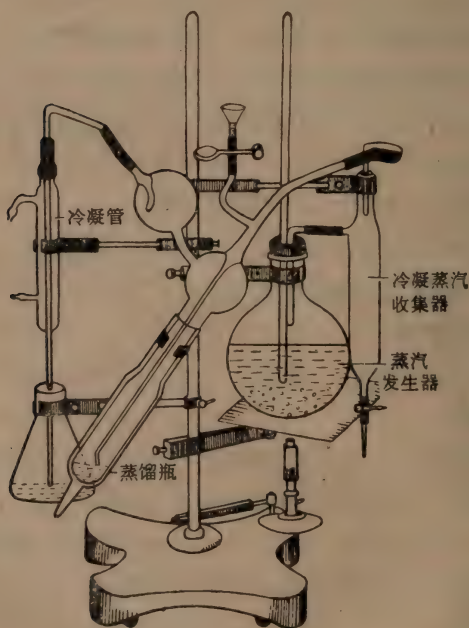


图 8 微量克氏定氮装置

按图 8 装置仪器，要求稳妥便于操作。由于定氮仪的进出口都是细管，而且是由几个部分连接在一起的整套装置，所以不能用一般方法来清洗，只能采用蒸汽冲洗。此外在整个测定过程中要求没有漏气现象。因此在蒸汽冲洗过程中还要检查装置有否漏气。

蒸汽发生器中加三分之二体积的水，几滴甲基红指示剂和沸石，用硫酸调水至橙红色表示水呈酸性，因为只有在酸性条件下，水中的氨才不会蒸出。打开漏斗下夹子，加热至水沸腾，使蒸汽通入仪器的每一部分，达到清洗目的。在冷凝管下放一盛器承接冷凝水。然后关紧漏斗下面夹子，再冲洗五分钟，冲洗完毕移开煤气灯，夹紧蒸汽发生器和收集器间的连接橡皮管，蒸馏瓶里的废液由于减压倒吸到收集器中，打开收集器下端的活塞排除废液。如此反复清洗二次。

## 2. 标准硫酸铵测定

为了进一步检查仪器有否漏气和熟练操作，常用已知浓度的硫酸铵测试 2~3 次。

用胖肚吸管量取  $0.01N$  标准盐酸 25 毫升(或 3% 硼酸 10 毫升)，注入到三角瓶中再加入 2 滴甲基红指示剂(采用硼酸吸收时则加入混合指示剂)；将此三角瓶承接在冷凝管下端，并使冷凝管的出口浸入液内，注意在此操作前必须先打开收集器活塞，以免三角瓶内液体倒吸。正确吸取 2 毫升 0.6 毫克/毫升硫酸铵溶液，加到漏斗中，并小心打开漏斗下夹子，使硫酸铵流入蒸馏瓶，用 3~5 毫升蒸馏水分三次清洗漏斗，也让其流入蒸馏瓶中。再用量筒量取 5 毫升  $10N$  氢氧化钠，通过漏斗慢慢流入蒸馏瓶，然后用少量水洗漏斗并留少量水在漏斗内作水封。关闭收集器活塞，加热蒸汽发生器，使蒸汽冲入蒸馏瓶内，反应生成的氨逸出被吸收在盛有酸液的三角瓶

中。从蒸馏瓶上部的圆球烫手开始计算时间,蒸 3 分钟,此时氨已蒸馏完全,放下承接的三角瓶,让冷凝管出口离开液面,继续蒸 1 分钟并用蒸馏水冲洗冷凝管出口外壁。取下三角瓶,用 0.01*N* 标准氢氧化钠滴定(如用硼酸吸收可用 0.01*N* 标准盐酸滴定)。记下所耗的碱(或酸)的体积。

蒸馏完毕后,移去火焰,夹紧蒸汽发生器和收集器间的橡皮管,排除反应完毕的废液,并用水洗漏斗几次,废液也通过减压从收集瓶排除,如此冲洗后即可进行下一个样品测定。

标准硫酸铵样品连续测定三次,其滴定数据差值不得超过 ±0.05 毫升,否则说明操作有误差。另取 2 毫升水代替硫酸铵溶液进行空白测定。取三次滴定数据的平均值进行含氮量计算,并将结果与标准值进行比较。

每毫升硫酸铵中含氮量按下式计算:

氮的毫克数/毫升

$$= \frac{[(25 \times N_1 - A \times N_2) - (25 \times N_1 - B \times N_2)] \times 14.008}{V}$$

公式可简化为:

$$\text{氮的毫克数/毫升} = \frac{(B - A)N_2 \times 14.008}{V}$$

式中: A 为滴定样品所耗氢氧化钠毫升数, B 为滴定空白所耗氢氧化钠毫升数,  $N_1$  为盐酸的当量浓度,  $N_2$  为氢氧化钠的当量浓度, V 为测定所用硫酸铵溶液的毫升数。

### 3. 豆腐废水含氮量测定

取四个清洁干燥的消化管,加入约 50 毫克的催化剂,用吸管加入 1 毫升均一的豆腐废水(吸管要接近消化管底部,不

使样品粘附在瓶口或瓶颈),再加 1 毫升浓硫酸。另取二个消化管加入 1 毫升水代豆腐废水,其余试剂同上,此为空白。将消化管放在通风柜内的消化炉上加热,先用小火,待水份蒸发后可用略大些的火加热。消化管内液体逐渐由黄色变为黑色,继续消化,黑色的碳又逐渐被氧化成浅黄色。为了缩短消化时间,此时可以取出消化管,稍冷后沿壁加入 30% 过氧化氢 2 滴加速氧化。继续加热直至溶液呈淡蓝色止,此时消化已完全。

将消化液在定氮仪上进行含氮量测定,方法同硫酸铵测定。为把消化瓶中的消化液全部转移到蒸馏瓶中,可在消化管瓶口上涂一层薄薄的凡士林,再小心地将消化液注入漏斗流入蒸馏瓶中,并用蒸馏水将消化管清洗三次(每次用 2 毫升蒸馏水),把每次洗液也倒入漏斗内。

测定结果按上述公式进行计算,求得豆腐废水中的含氮量。

## 20. 氨基氮测定——甲醛滴定法

### 一、目的

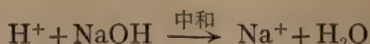
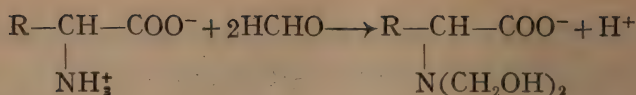
掌握氨基酸的两性离子性质,以此法定量测定发酵液中氨基氮含量。

### 二、原理

氨基酸是有氨基与羧基的两性化合物,在溶液中以两性离子状态存在。在一般条件下碱不能直接滴定其氨基上游离下来的氢离子。但是用甲醛处理后,由于甲醛能与氨基相结合使氨基上的氢离子游离,这样就可以用碱来滴定,从而计算氨基酸的含量。

反应式:





甲醛滴定法简单易行，在发酵工业中常用此法测定发酵过程中发酵液内氨基氮含量变化，以了解可被微生物利用的氮源的量，并以此作为控制发酵生产的指标之一。甲醛滴定法快速，但不能精确测定溶液中的氨基数量。脯氨酸与甲醛作用时产生不稳定的化合物，使结果偏低；酪氨酸含有酚羟基，滴定时也要消耗一些碱，可使结果偏高；此外溶液中若有铵存在也可与甲醛发生与氨基类似的反应，往往使结果偏高。

### 三、实验材料，仪器和试剂

#### 1. 材料

发酵液；滤纸。

#### 2. 仪器

吸管 2 毫升(×2)，5 毫升(×1)；量筒 10 毫升(×1)；碱式滴定管 25 毫升(×1)；三角烧瓶 100 毫升(×4)；漏斗(×1)。

#### 3. 试剂

1% 酚酞指示剂：称取 1 克酚酞，以 95% 乙醇溶解稀释至 100 毫升。

0.1% 甲基红指示剂：称取甲基红 0.1 克，以 95% 乙醇溶解稀释至 100 毫升。

0.02858*N* 氢氧化钠标准溶液\*：精确吸取一定量的已标

---

\* 在生产部门为了达到快速测定的目的，选择标准氢氧化钠的浓度为 0.02858 *N*，以此数值代入计算公式可使计算简化为：氨基氮毫克/100 毫升 = 20 × *V*。

定的 0.5*N* 氢氧化钠标准液,用蒸馏水稀释至 0.02858*N*。

18% 中性甲醛: 取含量为 36~40% 的甲醛溶液 100 毫升 (冬天如有沉淀,须在 27℃ 左右保温溶解,不溶物则需过滤除去),加入等量蒸馏水,加酚酞指示剂数滴,以 0.1*N* 氢氧化钠中和至微红色,保存备用。

0.3*N* 硫酸。

#### 四、操作步骤

发酵液用滤纸过滤在三角烧瓶中,从中吸取 2 毫升滤液于另一三角瓶内,加蒸馏水 10 毫升,甲基红指示剂 2 滴,以 0.3*N* 硫酸调节溶液至红色,再用 0.02858*N* 氢氧化钠调节溶液至橙色,使成中性。加 18% 中性甲醛溶液 4 毫升,摇匀静置 10 分钟,加 1% 酚酞指示剂 8 滴,用 0.02858*N* 氢氧化钠标准溶液滴定至微红色为终点(作二次重复)。

空白试验是在三角烧瓶中加入 12 毫升蒸馏水,2 滴甲基红指示剂,然后操作步骤同发酵液的测定。

编号	空白 (毫升)	发酵液 (毫升)	0.02858 <i>N</i> 氢氧化钠消耗量 (毫升)	氨基氮毫克/100 毫升
1	水 2	—		
2	—	2		
3	—	2		

#### 五、计算

$$\begin{aligned}\text{氨基氮毫克/100 毫升} &= \frac{NV \times 0.014 \times 100 \times 1000}{2} \\ &= \bar{V} \times 20\end{aligned}$$

式中: *N* 为氢氧化钠标准溶液浓度即 0.02858*N*,

*V* 为滴定所消耗的标准氢氧化钠溶液的毫升数。

## 21. 蛋白质浓度测定(一)

### ——福林-酚试剂法<sup>[7,8]</sup>

#### 一、目的

学习一种常用的蛋白质浓度测定方法。

#### 二、原理

福林-酚试剂 (Folin-phenol reagent) 的显色包括二步反应: 第一步是在碱性条件下, 蛋白质与铜作用生成蛋白质-铜复合物; 第二步是蛋白质-铜复合物还原磷钼酸-磷钨酸试剂, 生成蓝色物质, 在一定条件下, 蓝色强度与蛋白质的量成正比。

福林-酚试剂法是生化工作领域里应用较广泛的一种蛋白质浓度测定方法。它的优点是操作简便, 灵敏度高, 可测定范围是 25~250 微克蛋白质; 缺点是该试剂只与蛋白质中的酪氨酸、色氨酸起反应, 因此本方法有蛋白质的特异性影响, 即不同蛋白质因酪氨酸、色氨酸含量不同而使显色强度稍有不同, 标准曲线也不是严格的直线形式。

#### 三、实验材料, 仪器和试剂

##### 1. 实验材料

结晶牛血清白蛋白(生化试剂, 上海东风试剂厂)。

##### 2. 仪器

试管 1.5×15 厘米(×13); 吸管 0.5 毫升(×1), 1 毫升(×3), 5 毫升(×1); 72 型分光光度计。

##### 3. 试剂

试剂甲: (A) 10 克碳酸钠、2 克氢氧化钠和 0.25 克酒石酸钾钠(或其钾盐或钠盐)溶解于 500 毫升蒸馏水中。

(B) 0.5 克硫酸铜( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )溶解于 100 毫升蒸馏

水中。每次使用前将(A)50份与(B)1份混和,即为试剂甲。

试剂乙: 在 1.5 升容积的磨口回流瓶中加入 100 克钨酸钠( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 25 克钼酸钠( $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )及 700 毫升蒸馏水,再加 50 毫升 85%磷酸,100 毫升浓盐酸充分混和,接上回流冷凝管以小火回流 10 小时。回流结束后,加入 150 克硫酸锂,50 毫升蒸馏水及数滴液体溴,开口继续沸腾 15 分钟,驱除过量的溴,冷却后溶液呈黄色,微带绿色(如仍呈绿色,须再重复滴加液体溴的步骤)稀释至 1 升,过滤,滤液置于棕色试剂瓶中保存。使用时用标准氢氧化钠滴定,以酚酞为指示剂,然后适当稀释(约加水 1 倍)使最终浓度为 1N 酸。

#### 四、操作步骤

##### 1. 标准曲线制作

称取结晶牛血清白蛋白 2.5 毫克溶解于 10 毫升蒸馏水

管号	含蛋白质量 (微克)	2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 牛血清白蛋白 (毫升)	H <sub>2</sub> O (毫升)	各管迅速混合,放置 30 分钟 加入试剂甲 5 毫升,混合放置 10 分钟,加入试剂乙 0.5 毫升	OD <sub>550</sub>
1	0	0	1.0		
2	50	0.2	0.8		
3	50	0.2	0.8		
4	100	0.4	0.6		
5	100	0.4	0.6		
6	150	0.6	0.4		
7	150	0.6	0.4		
8	200	0.8	0.2		
9	200	0.8	0.2		
10	250	1.0	0		
11	250	1.0	0		



中,使成 250 微克/毫升。

取试管 11 支,按表加入牛血清白蛋白标准溶液及蒸馏水。以后加试剂甲 5 毫升,混合后室温下放置 10 分钟,再加 0.5 毫升试剂乙,立即混合均匀(这一步混和速度要快,否则会使显色程度减弱),30 分钟后,以不含蛋白质,试剂量相同的管为空白,在 72 型分光光度计中,选用 650 毫微米,测定 OD 值。

以蛋白质含量为横座标,光密度值为纵座标作出标准曲线。

## 2. 样品测定

待测样品溶液 1 毫升(适当稀释至约含 25~250 微克蛋白质),加试剂甲、乙及比色等操作步骤同标准曲线操作。

由待测样品 OD 值,查标准曲线,求得蛋白质含量乘以稀释倍数,即得样品的蛋白质含量值。

# 22. 蛋白质浓度测定(二)

## ——染色测定法<sup>[9]</sup>

### 一、目的

学习考马斯亮蓝染色法测定蛋白质浓度。

### 二、原理

染色测定法是将蛋白质样品固定在各种类型纤维膜上,与各种类型染料结合后,把被染色的蛋白质洗脱下来,在适当波长下进行比色测定。这种方法的特点是灵敏度高,可以测定几微克、甚至零点几微克水平的蛋白质,只需少量蛋白质溶液就可分析测定。

本实验选用层析滤纸为支撑物质,三氯乙酸为固定剂,考马斯亮蓝为染料的测定方法。考马斯亮蓝和蛋白质通过范德

瓦尔键结合,在一定蛋白质浓度范围内,蛋白质的染色符合比尔定律。

本方法可允许的测定范围是 2~20 微克蛋白质。受蛋白质的特异性影响较小,除组蛋白外,其他不同种类蛋白质的染色强度差异不大。

### 三、实验材料,仪器和试剂

#### 1. 实验材料

牛血清白蛋白(或其他纯蛋白质);层析滤纸。

#### 2. 仪器

微量吸管 20 微升( $\times 1$ ); 试管  $1.5 \times 5$  厘米( $\times 12$ ); 吸管 0.1 毫升( $\times 1$ ), 2 毫升( $\times 1$ ); 玻璃缸; 72 型分光光度计。

#### 3. 试剂

染色液: 0.25 克考马斯亮蓝 R-250(Coomassie brilliant blue R-250)溶解于含 7.5% 醋酸, 5% 甲醇的水溶液 100 毫升中。

20% 三氯乙酸溶液: 20 克三氯乙酸加蒸馏水至 100 毫升。

脱色液: 含 7.5% 醋酸和 5% 甲醇的水溶液。(使用过的脱色液,加少量活性炭处理,过滤后可反复使用。)

洗脱液: 含 0.12N 氢氧化钠 80% 的甲醇溶液。

3N 盐酸溶液: 25 毫升 12N 盐酸加蒸馏水至 100 毫升。

### 四、操作步骤

#### 1. 标准曲线制作

称取纯牛血清白蛋白 1 毫克溶解在 1 毫升蒸馏水中, 使成 1 毫克/毫升标准蛋白溶液。

(1) 点样: 取  $5 \times 20$  厘米滤纸一张, 分成五等分。用微量吸管取标准蛋白溶液 5、10、15、20 微升, 分别点样在各等分

滤纸的中央，或先将蛋白质标准液稀释成 0.25、0.5、0.75、1 毫克/毫升，分别点样 20 微升于滤纸上，使蛋白质含量分别相当于 5、10、15 及 20 微克。待样品斑点充分干燥后，进行固定。

(2) 固定：点好样的滤纸浸没在 20% 三氯乙酸溶液中 5~10 分钟，时时轻轻搅动。

(3) 染色：将三氯乙酸固定好的滤纸浸没在染色液中，30°C 染色 60 分钟（或固定某种温度  $\pm 1^\circ\text{C}$ ，一定时间  $\pm 1'$ ）。

(4) 脱色：为了除去未与蛋白质结合的染料，需充分脱色。将已染色的滤纸浸没在脱色液中，十余分钟或更长时间。如此反复数次，至滤纸背景基本无色。

(5) 洗脱：剪下滤纸的染色蛋白质部分，要求各蛋白质浓度的滤纸片大小一致，另在其附近剪一块面积大小一样的滤纸背景作为空白。分别将滤纸片放入试管中，加 1.8 毫升洗脱液，摇动，室温放置，使滤纸片颜色洗净为止（约 5 分钟）。再加 0.09 毫升 3N 盐酸，摇动，显现蓝色。如果滤纸破碎，需离心除去。

(6) 比色：取洗脱液的上清液部分放入 0.5 厘米光径的比色杯，以空白管作对照在 590 毫微米进行比色测定，读取光密度 OD 值。蛋白质含量为横座标，OD 值为纵座标绘制标准曲线。

## 2. 样品测定

待测蛋白质样品适当调节至约 0.5~1 毫克/毫升浓度，取 20 微升点样于滤纸上，使完全吸收，充分干燥，然后在上述标准蛋白样品测定的相同条件下操作。注意要剪取同样大小面积的滤纸片进行洗脱，并在 590 毫微米进行比色，读取 OD 值。根据 OD 值从标准曲线查得蛋白质含量。

## 23. 血清蛋白质醋酸纤维薄膜电泳<sup>[5, 10]</sup>

### 一、目的

学习蛋白质电泳的一般原理和方法，掌握醋酸纤维薄膜电泳分离蛋白质技术。

### 二、原理

带电质点循着与它带相反电荷的电极移动的现象称为泳动。带电质点之所以能在电场中向一定的方向移动，并具有一定的移动速度，是取决于带点质点本身所带的电荷、电场强度、溶液的 pH 等因素。蛋白质分子在溶液中的电泳是由于蛋白质的分子上具有一些自由的、可解离的基团如  $-\text{COOH}$ ； $-\text{NH}_2$ ； $-\text{OH}$  等，因而在某种 pH 值溶液中蛋白质分子就带有一定电荷，一个混合的蛋白质样品由于各蛋白质的等电点不同，在相同的 pH 溶液中所带的电荷性质不同，电荷的数目不同，在电场中各种蛋白质泳动的方向和速度也不相同，从而使蛋白质混合样品得到分离。电泳技术在生物化学研究中被广泛用来分离分析生物物质，如蛋白质、氨基酸、核酸等。

本实验采用的醋酸纤维薄膜电泳，是近年来推广的电泳方法之一，它是将蛋白质混合物点在醋酸纤维薄膜上，然后放在存有一定 pH 缓冲液的电泳槽上，通电一定时间，控制一定的电压进行电泳，经电泳后的薄膜放在氨黑 10B 中染色，再经脱色液浸泡去除未与蛋白结合的染料，即可观察到各组份蛋白质的电泳图谱，由于染料与蛋白质的结合是与蛋白质的量成正比的，因此将各蛋白区带剪下，分别用  $0.4N$  氢氧化钠浸洗下来可以进行比色测定其量。

醋酸纤维薄膜电泳与纸上电泳相比有如下优点：

第一，电泳图谱清晰，提高了定量测定的正确性。



第二, 电泳时间短, 45 分钟即可获得清晰图谱, 加上快速染色、脱色, 整个电泳过程仅需 90 分钟。

第三, 灵敏度高, 蛋白质浓度在 5 微克/毫升以上即可检出。

某些蛋白如胎儿甲种球蛋白在纸电泳上不易分离, 但醋酸纤维薄膜电泳却能清晰分离。此外电泳图谱可浸在冰醋酸乙醇溶液中透明化, 便于长期保存。

本实验采用人血清为材料, 血清中各蛋白质组份的等电点如下:

$\gamma$ -球蛋白	6.85~7.3
$\beta$ -球蛋白	5.12
$\alpha$ -球蛋白	5.06
白蛋白(A)	4.64

电泳时采用的缓冲液 pH 为 8.6, 这时蛋白质都带负电荷, 均向正极移动, 由于白蛋白的等电点最低, 所带的负电荷最多, 在电场中移动速度最快, 电泳图谱上的迁移率最大;  $\gamma$ -球蛋白等电点最大, 所带的负电荷最少, 迁移速度小, 在图谱上它最接近原点。

样品的电泳迁移速度除了与样品分子本身所带电荷有关外, 还取决于电场强度, 即每厘米的电位差, 一般采用 10~15 伏/厘米强度。电场强度越高, 则带电质点移动越快。缓冲液的离子强度也影响电泳的迁移速度, 离子强度越高, 电泳移动速度越慢, 反之则快, 一般最适离子强度在 0.02~0.2 之间。此外醋酸纤维薄膜要均匀, 通透性要好, 才能获得较清晰的图谱。

### 三、实验材料, 仪器和试剂

#### 1. 实验材料

人血清或兔血清。

## 2. 仪器

试管 1.5×15 厘米(×5); 毛细管 1.5 毫米内径; 染色缸。  
电泳仪, 电泳槽, 有盖搪瓷盘。

## 3. 试剂

0.4*N* 氢氧化钠。

巴比妥缓冲液 pH8.6: 巴比妥钠 6.38 克、巴比妥酸 0.83 克溶解在 500 毫升蒸馏水中。

染色液: 称取氨黑 10 B 0.5 克, 加甲醇 50 毫升, 冰醋酸 10 毫升, 蒸馏水 40 毫升。

漂洗液: 乙醇或甲醇 45 毫升, 冰醋酸 5 毫升, 水 50 毫升配成。

透明液: 冰醋酸 30 毫升加 95% 乙醇 70 毫升。

## 四、操作步骤

### 1. 醋酸纤维薄膜制备

将二醋酸纤维素置 110°C 烘箱烘 2 小时, 称 10 克放入 250 毫升密闭输血瓶中, 加入 70% 丙酮 100 毫升混和, 放在沸水浴上使充分溶解, 然后放置过夜或离心使杂质沉淀, 气泡消失后, 倒在清洁玻板上, 用涂膜器迅速向一个方向涂布, 待丙酮挥发后将膜取下, 夹在滤纸内压平备用。制备好的薄膜应该是白色不透明的, 正面光滑, 背面无光泽, 厚度应控制在 0.1~0.15 毫米, 干时脆, 湿时具有弹性。

目前醋酸纤维薄膜已有商品 (上海市徐汇区湖南路街道化剂室)。

### 2. 点样

将薄膜切成 2×7 厘米, 取二张浸在巴比妥缓冲液中, 使全部湿透, 取出后用滤纸吸干, 在无光泽一面距膜一端 1.5 厘米处, 用直径为 1.5 毫米的毛细管吸取血清, 划线点样, 待样

品渗入膜内后,放入电泳槽中,点样一端放在阴极,静止 10 分钟,使薄膜渗透的缓冲液达到平衡。

### 3. 电泳

开启电源,调节电流 0.4~0.6 毫安/厘米,电压 100~160 伏,通电 50~70 分钟。

### 4. 染色和漂洗

通电完毕取出薄膜,浸入染色液中,约 5 分钟左右取出薄膜,用漂洗液浸洗数次,使背景漂洗清楚为止,即可观察到电泳图谱(图 9)。

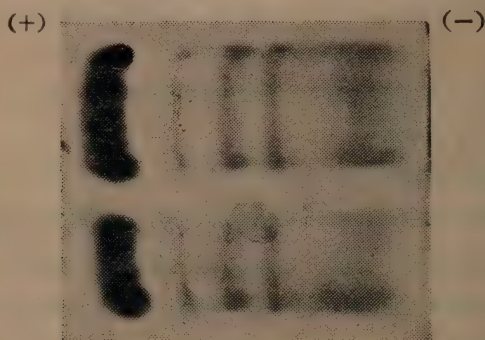


图 9 醋酸纤维薄膜血清蛋白电泳图谱

### 5. 薄膜透明化

取一条漂洗清楚的电泳薄膜,待干燥后浸入透明液中约 20 分钟,取出平贴于玻璃板上,使完全干燥即成透明膜,图谱仍清晰可见,便于长期保存。

### 6. 定量

取另一条漂洗好的薄膜用滤纸吸干后,剪下各蛋白质区带,分别放在试管内,薄膜浸在 5 毫升 0.4 N 氢氧化钠溶液中,振荡数次,使蛋白质区带浸出;另剪一条大小相同样品

的膜作为空白也以相同方式浸在 0.4N 氢氧化钠溶液中。取其浸出液在 580~600 毫微米比色, 测出  $A, \alpha_1, \alpha_2, \beta, \gamma$  各蛋白质组份的光密度值。

## 五、结果计算

光密度总和  $(T) = A + \alpha_1 + \alpha_2 + \beta + \gamma$

各组份蛋白质的百分数为\*:

$$\text{白蛋白}(\%) = \frac{A}{T} \times 100$$

$$\alpha_1 \text{ 球蛋白}(\%) = \frac{\alpha_1}{T} \times 100$$

$$\alpha_2 \text{ 球蛋白}(\%) = \frac{\alpha_2}{T} \times 100$$

$$\beta \text{ 球蛋白}(\%) = \frac{\beta}{T} \times 100$$

$$\gamma \text{ 球蛋白}(\%) = \frac{\gamma}{T} \times 100$$

## 24. 胎儿甲种球蛋白对流免疫电泳<sup>[10]</sup>

### 一、目的

学习对流免疫电泳技术, 测定胎儿甲种球蛋白。

### 二、原理

胎儿甲种蛋白质(AFP)是人体在胚胎时期存在于血清中的一种球蛋白, 它由胎儿肝细胞合成, 在出生后 1~2 周内即

---

\* 血清蛋白电泳正常值:

白蛋白	64%
$\alpha_1$ 球蛋白	2.8%
$\alpha_2$ 球蛋白	6.6%
$\beta$ 球蛋白	7.2%
$\gamma$ 球蛋白	14.4%



自行消失。但在原发性肝癌患者的血清中又可找到这种蛋白质。利用免疫学方法,将 3~6 个月的胎儿血清或强阳性的肝癌病人血清免疫家兔得到抗 AFP 血清,然后利用抗原抗体特异性结合的原理来测定病人血清中是否有 AFP 的存在,以此作为较早期肝癌诊断。常用的方法有琼脂免疫扩散法和对流免疫电泳。

对流免疫电泳的原理是,由于抗原 AFP 的等电点为 4.75,在 pH8.6 缓冲液中带负电荷,在电场中向阳极移动,而抗体(抗 AFP 血清)属于  $\gamma$ -球蛋白,其等电点为 6.85~7.3,在 pH8.6 缓冲液中虽然也带负电荷,但负电荷的数量少于 AFP,因此移动速度较 AFP 慢,又因琼脂载体具有较大的电渗作用(由于琼脂上极性基团带有负电荷,琼脂为固定相不移动,液相的正电荷向负极移动,引起电渗作用),对抗体的电渗作用超过了电泳作用,使抗体向阴极移动,因此只要将抗原置阴极一端,而抗体置阳极一端,通电后,抗原抗体就会相遇,在合适的浓度比例条件下形成白色的免疫沉淀线。又因电场的作用限制了抗体、抗原的自由扩散,而使其定向移动,因而增加了抗原、抗体的局部相对浓度,提高了灵敏度(一般认为比琼脂扩散法提高了 8~64 倍),同时又大大缩短了试验的时间。

### 三、实验材料,仪器和试剂

#### 1. 实验材料

正常人血清(稀释 10 倍); 胎儿血清(稀释 10 倍); AFP 抗血清。

#### 2. 仪器

载玻片; 吸管 5 毫升( $\times 1$ )。

电泳仪; 电泳槽; 4 毫米孔径打孔器(可用滴瓶的玻璃滴

管代替)。

### 3. 试剂

电泳缓冲液 pH8.6: 巴比妥钠 9 克, 0.1N 盐酸 65 毫升, 叠氮钠 1 克加蒸馏水 1 升。

1% 琼脂溶液: 取 1 克纯化过的琼脂或琼脂粉, 加巴比妥钠-盐酸缓冲液 pH8.6, 100 毫升, 水浴加热熔化而成。

## 四、操作步骤

### 1. 琼脂板制备

在干净的载玻片上, 放 3 毫升熔化的  $40^{\circ}\text{C}$  左右的 1% 琼脂, 并均匀涂布于整个载玻片上。冷却后琼脂凝结, 用内径 4 毫米打孔器按下图打孔。

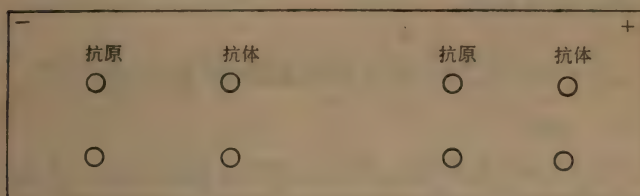


图 10 对流免疫电泳打孔示意图

### 2. 加样

用滴管取稀释 10 倍的正常人血清 (抗原) 放在左边一排抗原孔内。用另一支滴管取胎儿血清 (抗体) 放在右边一排抗原孔内。

用滴管吸取 AFP 抗血清 (抗体) 放在左、右两排抗体孔内。

### 3. 电泳

将已加好抗原、抗体的琼脂板放入电泳槽内, 两端用湿润的滤纸作盐桥, 使与槽内缓冲液相通。在抗原端接上负极, 抗

体端接上正极, 电流强度为 3 毫安/厘米, 通电 60 分钟。

#### 4. 结果观察

断电后取出玻板, 对光观察抗原与抗体结合的沉淀线, 若有沉淀线产生为 AFP 阳性, 反之 AFP 为阴性。

### 五、实验注意点

1. 琼脂板孔径要打整齐, 孔径大小要适当, 打孔时不能让琼脂移动。

2. 电泳载体所用的琼脂要经过选择, 其电渗作用不宜过小, 否则造成假阴性机率增大。

3. 电流不宜过大, 以免蛋白质变性。

4. 抗原浓度要适当稀释, 太浓或太稀都不易出现沉淀线或出现异常沉淀线。

## 25. 血清蛋白质聚丙烯酰胺凝胶电泳<sup>[11, 12]</sup>

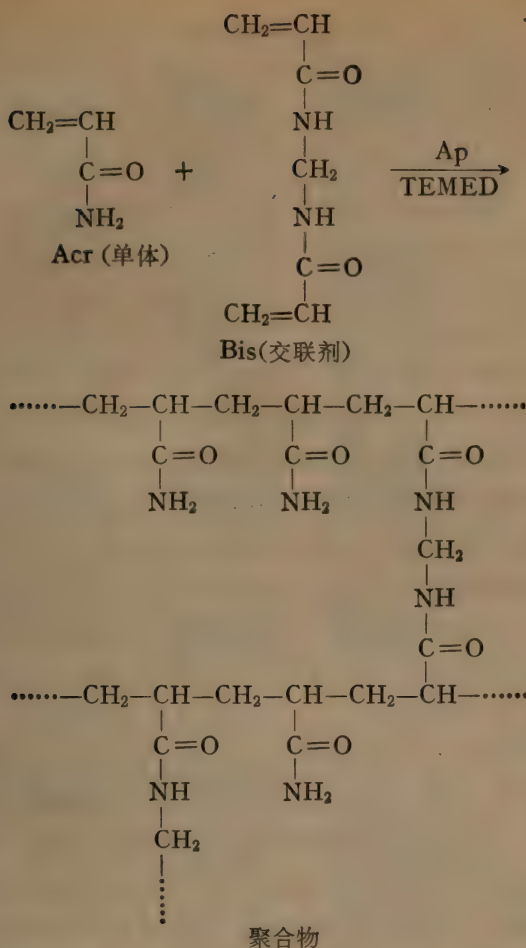
### 一、目的

学习聚丙烯酰胺凝胶电泳的原理和操作方法, 并应用于分离血清蛋白质。

### 二、原理

聚丙烯酰胺凝胶电泳是以聚丙烯酰胺凝胶作为载体的一种区带电泳。这种凝胶是由丙烯酰胺(简称为 Acr)和交联剂 N, N'-甲叉双丙烯酰胺(简称为 Bis)聚合而成的, 其聚合反应见下页。

Acr 和 Bis 在它们单独存在或混合在一起时是稳定的, 且具有神经毒性, 操作时应避免接触皮肤。但在具有自由基体系时, 它们就聚合。引发产生自由基的方法有化学的和光化学的方法两种。化学方法的引发剂是过硫酸铵(简称为 Ap), 催化剂是四甲基乙二胺(简称 TEMED); 光化学法是



以光敏感物如核黄素(简写  $V_{B_2}$ )来代替 Ap, 它们在紫外光照射下引发自由基团, 而使聚合。采用不同浓度的 Acr、Bis, Ap 和 TEMED 使之聚合, 产生不同孔径的凝胶。因此可按分离物质的大小、形状来选择凝胶浓度。选用时可参见下表:



凝胶浓度选用表

蛋白质分子量	适用的凝胶浓度 %
$>10^4$	20~30
$1 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$	15~20
$4 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$	10~15
$1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$	5~10
$>5 \times 10^5$	2~5

本实验采用不连续盘状聚丙烯酰胺凝胶电泳，即电泳系统是由二种以上不同 pH 的缓冲液和凝胶孔径所组成。电泳凝胶上层是低浓度大孔径称为浓缩胶，此胶的缓冲液为三羟甲基氨基甲烷-盐酸（简称 Tris-HCl 缓冲液），pH6.7；下层为小孔径凝胶称为分离胶，它的缓冲液是 Tris-HCl pH8.9；电极缓冲液为 pH8.3 的 Tris-甘氨酸。通电以后带电离子在凝胶系统中形成离子流，它们向正极的迁移率决定于离子电荷的数目、分子大小和形状。电荷数越多迁移率就大；相反分子越大、摩擦力大，迁移率就小。当电泳缓冲液中的甘氨酸进入浓缩胶层，碰到 pH6.7 的缓冲液，使甘氨酸的平均负电荷大大减少，结果降低了甘氨酸向正极移动的迁移率。蛋白质样品在 pH6.7 时，带有较多的负电荷，因此它的迁移速度超过了甘氨酸，蛋白质堆积在甘氨酸前面，而胶层中的氯离子全都带有负电荷，又有较小的分子和摩擦力，比蛋白质迁移快，结果在浓缩胶层中，离子迁移率形成  $\text{Cl}^- > \text{蛋白质}^- > \text{甘氨酸}$  这样的次序。蛋白质在氯离子和甘氨酸离子之间，被浓缩成很狭的薄层，如图 11 所示。当离子流进入 pH8.9 的小孔径分离胶层时，甘氨酸带有较多的负电荷，它的迁移速度超过了

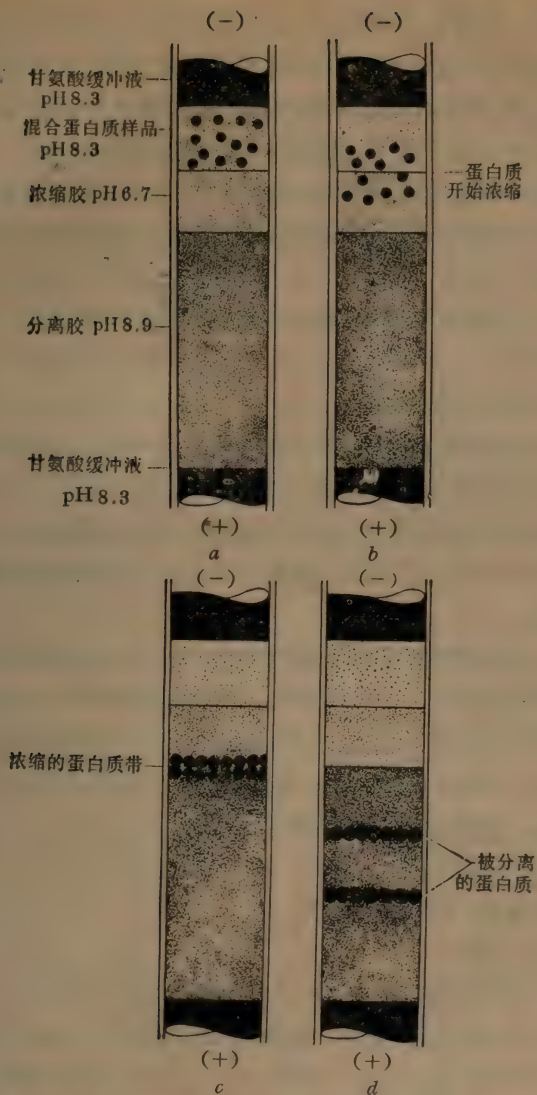


图 11 在盘状凝胶电泳中蛋白质的分离过程示意图

蛋白质。而蛋白质样品进入分离胶层后，由于各种蛋白质的等电点不同，使它们各自带有负电荷数不等，又因各蛋白质分子的大小、形状不一，摩擦力不同，因此在分离胶层中各蛋白质组份的迁移率不同，电泳后能达到分离的目的。

聚丙烯酰胺凝胶作为载体应用于电泳分离高分子物质，它兼有电泳和分子筛层析的双重作用，和其他区带电泳相比具有如下优点：

1. 用聚丙烯酰胺凝胶作载体，样品不易扩散，且能自动地浓缩成一个很薄的样品层，因此所需的样品量小（1~100微克），而且分离效果好。

2. 可以控制凝胶浓度，制成不同“孔径”的凝胶，使分子筛效应和电荷分离效应结合起来，因此比任何一种单一效应具有更高的分辨能力。例如纸电泳分离血清蛋白只能获得4~5条区带，而聚丙烯酰胺凝胶电泳对血清蛋白可以获得20多条区带。

3. 聚丙烯酰胺具有热稳定性、在一定浓度范围内是透明的、机械强度高、化学上惰性、不带电荷因而不会产生电渗现象、吸附作用很小等优点，因此目前广泛应用于高分子化合物（蛋白质、多肽、核酸）的分离及定性、定量分析中。

### 三、实验材料、仪器和试剂

#### 1. 实验材料

人血清；乳胶管；滤纸。

#### 2. 仪器

二通玻璃管  $10 \times 0.6$  厘米（内径）；实心玻棒  $3 \times 0.8$  厘米（两头切口磨光）；吸管 1 毫升（ $\times 3$ ），5 毫升（ $\times 4$ ），10 毫升（ $\times 1$ ），0.5 毫升（ $\times 1$ ），0.1 毫升（ $\times 2$ ）；小烧杯 100 毫升（ $\times 2$ ）；染色槽；脱色缸；注射器，注射针（5 号），微量进样器 50 微升。

电泳仪(722 型); 圆盘电泳槽。

### 3. 试剂

分离胶缓冲液, Tris-HCl 缓冲液 pH8.9: 取 1N 盐酸 48 毫升, Tris 36.3 克, 用无离子水溶解后定容至 100 毫升。

浓缩胶缓冲液, Tris-HCl 缓冲液 pH6.7: 取 1N 盐酸 48 毫升, Tris 5.98 克, 用无离子水溶解后定容至 100 毫升。

电泳缓冲液, Tris-甘氨酸缓冲液 pH8.3: 称取 Tris 6 克, 甘氨酸 28.8 克, 溶于无离子水后, 定容至 1 升。用时稀释 10 倍。

30% Acr-Bis 贮存液: 30 克 Acr(BDH 产品), 0.8 克 Bis (生化试剂), 用无离子水溶解后定容到 100 毫升, 不溶物过滤去除后置棕色瓶贮于冰箱。

0.5% 氨黑染色液: 称取 0.5 克氨黑 10B, 溶解于 100 毫升 7% 的冰醋酸溶液中。

TEMED (BDH 产品); 10% 过硫酸铵(分析纯, 新鲜配制); 25% 蔗糖溶液(或用甘油代替); 0.05% 溴酚蓝溶液; 5% 冰醋酸溶液。

## 四、操作步骤

### 1. 凝胶管制备

血清蛋白质电泳采用分离胶和浓缩胶组成的凝胶管, 下层为 7.5% 凝胶浓度的分离胶, 上层为 3% 凝胶浓度的浓缩胶, 其制备如下。

#### (1) 分离胶制备:

Acr-Bis 贮备液	5.0 毫升
Tris-HCl 缓冲液 pH8.9	2.5 毫升
TEMED	0.01 毫升
无离子水	12.39 毫升



上述溶液置小烧杯中混匀，再加入 10% 过硫酸铵 0.1 毫升，混匀后迅速加入到垂直放置的、下端用相同粗细的实心玻璃棒封闭的玻璃管中，每管约加 1.8~2 毫升胶液，然后用注射器小心地在胶液表面上覆盖一层水，使凝胶聚合时有一水平表面，同时使凝胶形成过程中与空气隔绝，以减少空气对凝胶聚合的影响，放置 30 分钟后，即可看到胶和水的清晰界面，说明聚合作用完成。倒去水层并用滤纸吸干，再制备浓缩胶层。

### (2) 浓缩胶制备：

Acr-Bis	
贮备液	1.00 毫升
Tris-HCl	
缓冲液 pH6.7	1.25 毫升
TEMED	0.005 毫升
无离子水	7.64 毫升
10% 过硫酸铵	0.1 毫升

混合后迅速加到已制备好的分离胶的上面，约加 1 厘米厚，上面同样小心地覆盖一层水，放置 30 分钟，凝胶形成后，去除水层，准备加样。

### 3. 加样

取血清样品 0.2 毫升，25% 蔗糖溶液 0.2 毫升，0.05% 溴酚

图 12 聚丙烯酰胺凝胶血清蛋白电泳图谱

电泳条件：凝胶浓度 7.5%，电流 3 毫安/条，电泳时间 2.5 小时

蓝溶液 0.1 毫升混合后,于每胶管浓缩胶上面加 30 微升。

#### 4. 电泳

将已加好样的凝胶,去除下面连接的玻棒塞,垂直插到盘状电泳上槽的孔中,并塞紧不使漏水。然后在样品上面小心地加入电泳缓冲液至满管,切勿搅动样品,上下电泳槽倒入缓冲液,盖好电泳槽盖子,接通电源,阴极在上,阳极在下,电流控制在 2~5 毫安/管。当溴酚蓝指示剂到达距胶管底部 1 厘米处时,停止电泳,取出胶管。用带长注射针的注射器,小心地沿着凝胶和玻管壁之间慢慢推入水并转动一周,胶和玻管就脱离滑出,或用洗耳球轻轻地把凝胶压出。

#### 5. 染色

将凝胶放入氨黑染色液中,染色 1 小时以上,然后取出放在 5% 冰醋酸中漂洗,并多次更换漂洗液,直至无蛋白区带处凝胶的底色褪净为止,血清蛋白电泳图谱即清晰可见。

### 26. 血清脂蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳<sup>[13]</sup>

#### 一、目的

学习血清脂蛋白电泳分离方法。

#### 二、原理

聚丙烯酰胺凝胶电泳,具有分子筛和电泳的双重作用,它的分辨力高,以此为电泳载体,可以将血清脂蛋白各组分清楚分离。又在本法中用乙酰苏丹黑预先和脂蛋白结合,染成黑蓝色,因此在电泳后不必染色,即可清楚地直接观察电泳图谱,进行组分分析,也可进一步采用光密度计法进行定量测定。

#### 三、实验材料,仪器和试剂

##### 1. 实验材料

人血清。

## 2. 仪器

玻璃管  $10 \times 0.6$  厘米; 烧杯 100 毫升( $\times 2$ ); 吸管 0.1 毫升( $\times 3$ ), 1 毫升( $\times 6$ ), 5 毫升( $\times 2$ ), 10 毫升( $\times 1$ ); 小试管  $1.5 \times 7.5$  厘米; 注射器; 注射针; 微量进样器 50 微升; 电泳仪; 圆盘电泳槽。

## 3. 试剂

乙酰苏丹黑 B\*乙醇饱和溶液; 50% TEMED(四甲基乙二胺); 25% 蔗糖溶液。

凝胶缓冲液,  $0.5M$  Tris (三羟甲基氨基甲烷)- $0.04M$  EDTA (乙二胺四乙酸) 缓冲液 pH8.8: 取 Tris 6.057 克, EDTA 1.17 克, 加无离子水溶解后定容至 100 毫升。

电泳缓冲液, 甘氨酸-Tris 缓冲液 pH8.3: 称取甘氨酸 28.8 克, Tris 60 克, 用无离子水溶解后定容至 1 升。

20% 丙烯酰胺溶液: 取丙烯酰胺 19.6 克, 双丙烯酰胺 0.4 克, 用无离子水溶解后定容至 100 毫升, 不溶物过滤去除后贮于棕色瓶中冰箱保存。

10% 过硫酸铵溶液: 取过硫酸铵 0.5 克, 溶于 5 毫升无离子水中, 新鲜配制。

## 四、操作步骤

### 1. 凝胶制备

脂蛋白电泳一般采用分离胶和浓缩胶组成的凝胶管。下层为分离胶, 约含 4% 丙烯酰胺; 上层为样品胶, 约含 2.5% 丙烯酰胺。制备方法按下述进行。

---

\* 乙酰苏丹黑制备: 2 克苏丹黑 B 加 60 毫升吡啶, 40 毫升醋酸酐, 混合放置过夜, 再加 3 升蒸馏水, 乙酰苏丹黑析出, 经抽滤, 沉淀再溶于丙酮中, 将丙酮蒸发后, 剩下的即为乙酰苏丹黑 B。

### (1) 分离胶制备:

20% 丙烯酰胺溶液	2.4 毫升
Tris-EDTA 缓冲液 pH8.8	1.2 毫升
无离子水	7.0 毫升
50% TEMED 溶液	0.05 毫升

置小烧杯中, 混匀, 再加入 10% 过硫酸铵溶液 0.15 毫升, 混匀, 迅速用吸管分装在  $10 \times 6$  厘米玻璃管中(两通的玻管, 在玻管的一端用一小段相同直径的实心玻棒封闭, 玻管和玻棒间用一乳胶管固定, 并垂直放在小试管架上), 每管约加 1.8~2.0 毫升左右, 然后小心地在上覆盖一层蒸馏水, 注意切勿波动胶液, 放室温 30 分钟即可聚合完全。

(2) 浓缩胶制备: 除取 20% 丙烯酰胺溶液 1.8 毫升外, 其他试剂的量及操作方法同分离胶制备法。将上述分离胶上层的水吸干, 每管中加入浓缩胶液 0.2 毫升, 上面也覆盖一层水, 放 30 分钟聚合后即可使用。

### 2. 加样

取血清 0.18 毫升, 加乙酰苏丹黑 B 乙醇饱和溶液 0.02 毫升, 放  $37^{\circ}\text{C}$  保温 15 分钟, 使脂蛋白和染料结合, 再加入 25% 蔗糖溶液 0.2 毫升, 混合均匀, 取 30 微升此混合物加于已制备好的凝胶管中, 去除玻管下端连接的玻棒塞子, 准备电泳。

### 3. 电泳

将上述已加好样品的玻璃凝胶管, 插入盘状电泳上槽的孔中, 并务必不使漏水, 在上下两槽中分别加入 pH8.6 电泳缓冲液。在凝胶管样品上面, 先用电泳缓冲液加满胶管, 然后再使上槽缓冲液加到高出胶管上端 3~5 厘米。盖好电泳槽盖子, 即可通电, 使每支胶管电流达 3~5 毫安, 通电 30 分钟



左右，当样品前沿达到离凝胶下端 0.5~1 厘米处时停止电泳。

取出胶管，可以直接用肉眼观察各区带的位置。区带颜色深浅宽窄以(+)号表示，脂蛋白各组份位置如下图。

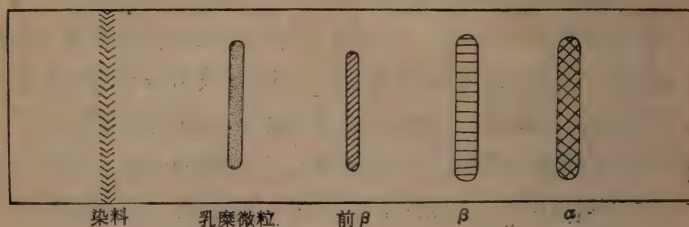


图 13 血清脂蛋白电泳各组份位置示意图

## 27. 蛋白质 N-末端测定<sup>[14,15]</sup>

### 一、目的

学习 DNS-氨基酸的制备及其在聚酰胺薄膜上层析的方法，作出标准氨基酸 DNS-衍生物的层析图谱。

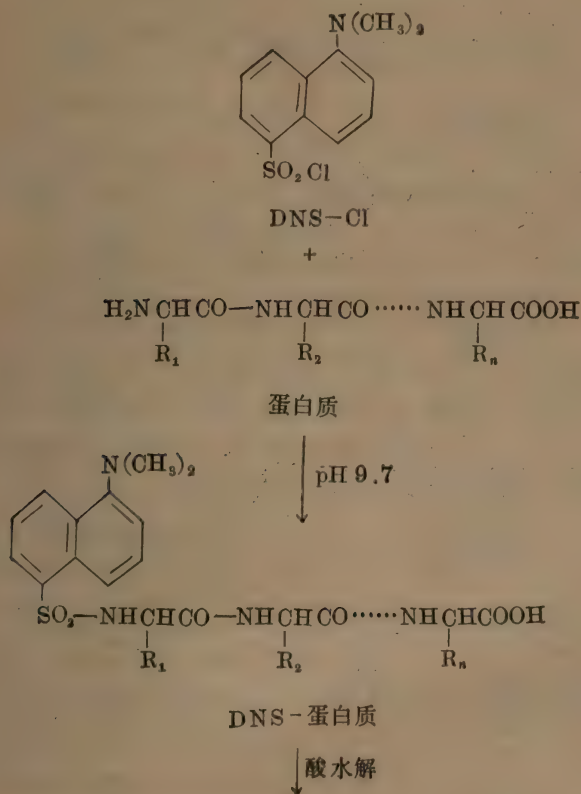
学习二甲氨基萘磺酰氯法(DNS-Cl 法)测定蛋白质 N-末端的技术。

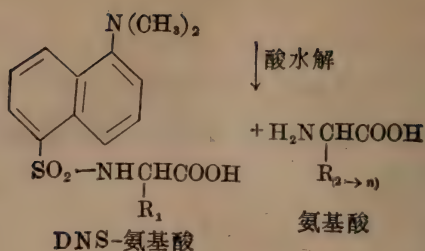
### 二、原理

二甲氨基萘磺酰氯 (1-Dimethylaminonaphthalene-5-Sulfonyl Chloride, 简称 DNS-Cl) 与氨基酸或肽的游离氨基形成的磺胺衍生物在紫外光 (365nm) 照射下，具有强烈的黄色荧光。蛋白质 N-末端的游离氨基与 DNS-Cl 缩合生成 DNS-蛋白质。在 5.7N 盐酸，105°C 水解 18 小时，DNS-蛋白质的肽键被打开，而 DNS 基团和氨基之间的键牢固结

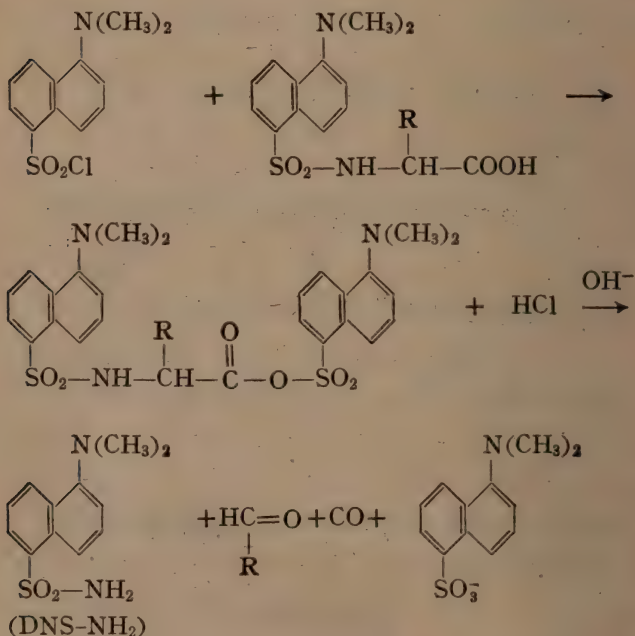
合, 除 DNS-色氨酸全部破坏和 DNS-脯氨酸(77%)、DNS-丝氨酸(35%)、DNS-甘氨酸(18%)、DNS-丙氨酸(7%)部分破坏外, 其余 DNS-氨基酸很少破坏。所形成的 DNS-氨基酸在酸性条件下, 可用乙酸乙酯抽提, 通过层析鉴定出 N-末端氨基酸的种类。

反应过程如下:

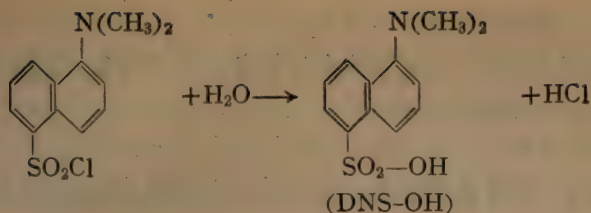




在有过量 DNS-Cl 存在下, 有副产物 DNS-NH<sub>2</sub>:



在 pH 高的情况下, DNS-Cl 要水解, 有副产物 DNS-OH:



DNS-NH<sub>2</sub> 和 DNS-OH 在紫外光照射下, 产生蓝色荧光, 可以与 DNS-氨基酸所呈现的黄色荧光区别开来, 在层析图谱上还可以借助它们的位置来确定氨基酸的种类。

本实验选用聚酰胺薄膜对 DNS-氨基酸进行双相层析(层析原理见实验五), 这种层析简易快速, DNS-氨基酸在聚酰胺薄膜上的荧光点也不易消失, 可保存较久。

### 三、实验材料, 仪器和试剂

#### 1. 实验材料

标准氨基酸溶液: 称取异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、缬氨酸、色氨酸、丙氨酸、甘氨酸、谷氨酸、酪氨酸各 0.5 毫克, 半胱氨酸、丝氨酸、谷氨酰胺各 2 毫克, 分别放在 13 支小指管中, 用 1 毫升 0.2M 碳酸氢钠溶解。

混合标准氨基酸溶液: 氨基酸品种和称量同标准氨基酸溶液。各种氨基酸称量后放在同一支小指管中, 用 0.2M 碳酸氢钠溶液 1 毫升溶解。

胰岛素溶液: 2 毫克胰岛素用 0.2M 碳酸氢钠溶液 1 毫升溶解, 使成 2 毫克/毫升浓度。

聚酰胺薄膜(浙江黄岩化学分析材料厂) 4×8 厘米, 4×4 厘米; 精密试纸 pH0.5~5.0。

#### 2. 仪器

小指管 1×10 厘米(×20); 毛细管内径 0.5 毫米; 滴管;



层析缸  $12 \times 20$  厘米。

紫外层析灯(上海科艺光学仪器厂); 真空泵; 温箱; 烘箱;  
电吹风; 尺; 铅笔。

### 3. 试剂

0.2M 碳酸氢钠溶液: 用无离子水配制, 并用氢氧化钠溶液调 pH 至 9.8。

层析溶剂系统:

第 I 相: 甲酸(85~95%): 水 = 1.5:100(V/V)

第 II 相: 苯: 冰醋酸 = 9:1(V/V)

DNS-Cl 丙酮溶液: 用丙酮(分析纯)配成 2.5 毫克/毫升溶液(密闭, 冰箱保存)。

6N 盐酸溶液; 1N 盐酸溶液; 水饱和的乙酸乙酯。

### 四、操作步骤

本实验分二部分, DNS-氨基酸的聚酰胺薄膜层析和胰岛素 N-末端的测定。

#### (一) DNS-氨基酸的聚酰胺薄膜层析

##### 1. DNS-氨基酸制备

以滴管吸取各种标准氨基酸溶液及氨基酸混合溶液 2 滴, 注入小指管内, 然后加入 2 滴(等体积) DNS-Cl 丙酮溶液, 摇匀, 以胶布封住管口,  $40^{\circ}\text{C}$  温箱保温 30 分钟。取出, 电吹风热风吹去丙酮, 以 1N 盐酸酸化至 pH 2~2.5, 加入水饱和的乙酸乙酯 4~5 滴, 摇匀, 上层乙酸乙酯层呈黄色荧光溶液, 含 DNS-氨基酸。

##### 2. 点样层析

取二张( $4 \times 8$  厘米)聚酰胺薄膜, 在离底边 0.6 厘米处用铅笔轻轻地每间隔 0.58 厘米画一点(共 13 点), 然后用毛细管将各种 DNS-氨基酸(注意取乙酸乙酯相, 不要取水相), 分

别点在相应的点子上，每个样品点样直径不超过 2 毫米。点样量以在紫外层析灯下能见明亮荧光为佳。点样后二张膜分别放入甲酸：水系统与苯：冰醋酸系统内进行单向层析，待溶剂前沿达到离膜顶端 0.3 厘米处取出，除去膜上溶剂，在紫外层析灯下观察结果并画出各斑点位置，计算各 DNS-氨基酸在上述两相溶剂系统中的  $R_f$  值。

另取一张聚酰胺薄膜(4×4 厘米)，在左下角距二边 0.6 厘米处，轻轻画一点子作为原点。用毛细管将标准 DNS-氨基酸混合液点样于此点内，点样直径不超过 2 毫米，然后进行双向层析。以甲酸-水系统作为第一向层析，层析后取出用电吹风除尽溶剂，再放入苯-冰醋酸系统作第二向层析。取出膜并待膜干燥后于紫外层析灯下观察结果并记录各斑点位置。

3. 将 DNS-氨基酸混合液双向层析后各斑点的位置与前二张 DNS-氨基酸单向层析结果比较确定各 DNS-氨基酸在双向层析后的位置。

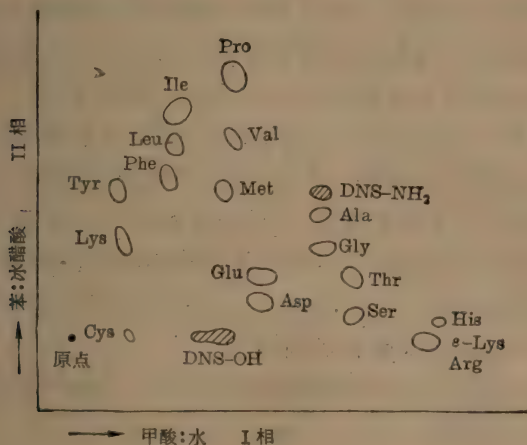


图 14 DNS-氨基酸双向层析图谱

图 14 DNS-氨基酸的层析图谱可作参考。

## (二) 胰岛素 N-末端测定

### 1. DNS-胰岛素的制备

取胰岛素溶液 3 滴于小指管内，加入 3 滴 DNS-Cl 丙酮溶液，摇匀，胶布封口后于 40°C 保温半小时。取出后真空抽干，残剩固体物即为 DNS-胰岛素。

### 2. 胰岛素的水解及 DNS-氨基酸提取

在含 DNS-胰岛素的小指管内加 0.2 毫升 6N HCl，在煤气灯上将管口封闭，于 110°C 烘箱内水解 12 小时左右。水解后打开封口，继续于 100°C 烘箱内蒸干。加 2 滴 0.2M NaHCO<sub>3</sub> 溶解剩留物，并用 1N HCl 调至 pH<sub>2</sub>~2.5（注意尽量小体积），加入水饱和乙酸乙酯 5~6 滴，有机相内即含有 DNS-氨基酸（胰岛素 N-末端的氨基酸）。

### 3. 层析

以毛细管吸取上述有机相点样于聚酰胺薄膜（4×4 厘米）的左下端离二边端线 0.6 厘米处，点样直径不超过 2 毫米，点样后在紫外灯下检查以见到明亮荧光为佳。在与原点相对的另二边缘分别点上对照用 DNS-Gly 与 DNS-Phe。

于甲酸-水系统走第一向层析，电风吹尽溶剂后，以苯乙酸系统走第二向层析，溶剂前沿不要走到标准氨基酸对照点。层析结束，待膜干燥后，于紫外层析灯下观察结果。

4. 将上述层析谱与 DNS-氨基酸标准图谱比较，由其相对位置确定胰岛素 N-末端的氨基酸种类。对照点作为进一步确定 N-末端氨基酸种类的参考。

另外，在胰岛素 N-末端的层析图谱上，除了属于末端的 DNS-Phe 和 DNS-Gly 二点外，在  $\epsilon$ -DNS-Lys 和 O-DNS-Tyr 位置上也有荧光斑点，这是胰岛素的氨基酸组份内，酪氨

酸和赖氨酸残基的侧链基团与 DNS-Cl 作用的产物，它不属于 N-末端的氨基酸，因为如果是 N-末端氨基酸，那么应该在 Bis-DNS-Tyr 及 Bis-DNS-Lys 的位置上产生荧光斑点。

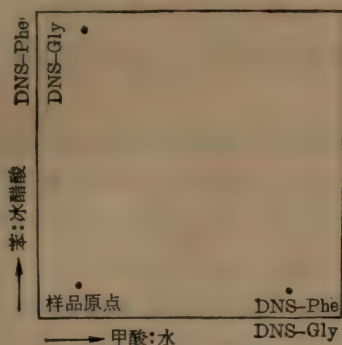


图 15 点样示意图

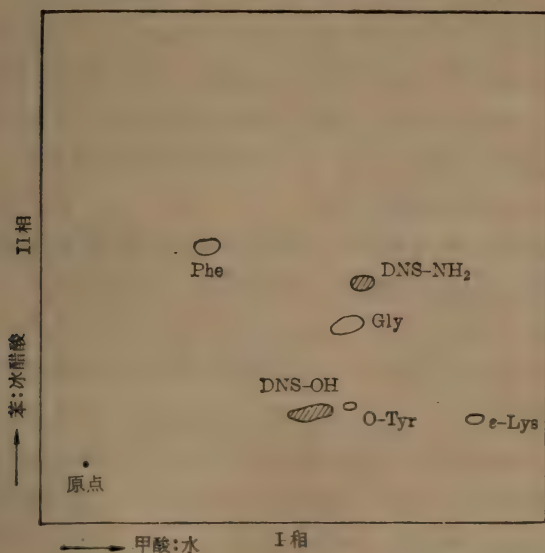


图 16 胰岛素 N-末端层析图谱



## 28. 珠蛋白的制备及其N-末端测定<sup>[5]</sup>

### 一、目的

学习从血液中分离红细胞并制备珠蛋白的方法；掌握二硝基氟化苯法定性测定珠蛋白N-末端氨基酸的方法。

### 二、原理

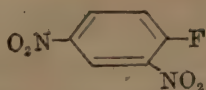
血液可分为血浆和血细胞两部分。血浆占全血容积的55%，血细胞占45%。血细胞中大部分是红细胞，红细胞除含65%水分外，主要成分是血红蛋白（约32%）。血红蛋白是一种色素蛋白，由珠蛋白和血色素复合而成。

为了制备珠蛋白，首先必须得到自由状态的红血球。这可以在新鲜全血中加入抗凝剂——柠檬酸钠或草酸钠，使血液不凝结，经离心取下层红血球，加水使胞壁膨胀破裂；或用乙醚、甲苯等破坏红血球膜，使血红蛋白释放出来，再用酸性丙酮处理，脱去血色素，获得无色的珠蛋白。为了增加血红蛋白的稳定性，在制备过程中可通入一氧化碳，制成碳氧血红蛋白。

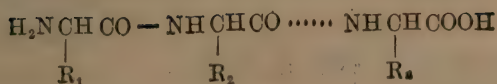
制备好的珠蛋白可采用二硝基氟化苯法（简称FDNB法）进行N-末端氨基酸的测定。

FDNB（二硝基氟苯）在pH8.5~9.0、室温条件下与蛋白质或肽的自由氨基定量而迅速地缩合为DNP-蛋白（二硝基苯基蛋白）或DNP-肽（二硝基苯基肽）。由于DNP与游离氨基缩合的键结合很牢固，不易被酸水解，因此当酸解时，其他肽键都已打开，而二硝基苯基团仍和N-端氨基酸形成DNP-氨基酸，这种黄色的DNP-氨基酸能溶解在有机溶剂中，因此可用乙醚将其抽提出来。然后经纸上层析或聚酰胺薄膜层析，根据其 $R_f$ 值，鉴定N-末端氨基酸。如果将黄色的DNP-氨基酸斑点从纸上洗下来，用分光光度计可以进一步定量测定。

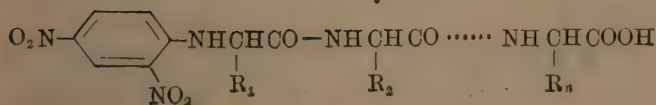
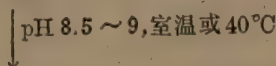
FDNB 法的反应过程如下:



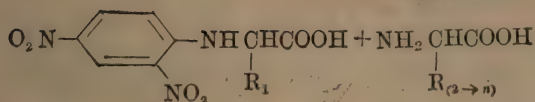
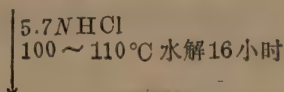
FDNB



蛋白质



DNP-蛋白质



DNP-氨基酸

氨基酸

### 三、实验材料, 仪器和试剂

#### 1. 实验材料

猪血或兔血。

DNP-缬氨酸标准液: 用丙酮配成 1 毫克/毫升的溶液。

透析袋 1×7 厘米; 层析滤纸 10×22 厘米; 精密试纸 pH

8.2~10; 黑色纸; 橡皮筋。

## 2. 仪器

小试管 1×10 厘米(×1); 刻度离心管(×3); 量筒 10 毫升(×1); 分液漏斗 25 毫升(×1), 100 毫升(×1); 布氏漏斗 4 厘米(×1); 吸滤瓶 250 毫升(×1); 三角烧瓶 50 毫升(×1); 灯泡瓶 100 毫升(×1); 层析缸; 毛细管内径 0.5 厘米; 滴管; 玻棒。

离心机; 天平; 烘箱; 尺; 铅笔。

## 3. 试剂

酸性丙酮: 丙酮:2*N* 盐酸 = 79:1(V/V)。

2.5% FDNB 乙醇溶液: 2.5 克二硝基氟苯溶于 100 毫升无水乙醇中。

0.2*M* 磷酸缓冲液 pH6.0: 12.3 毫升 0.2*M* 磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  71.64 克/升) 和 87.7 毫升 0.2*M* 磷酸二氢钠 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  31.21 克/升) 混合而成。

5.7*N* 盐酸(重蒸二次); 10% 碳酸氢钠; 0.9% 氯化钠; 乙醚; 丙酮。

## 四、操作步骤

### 1. 红细胞的制备

在刻度离心管中放入除去血纤维蛋白(预先用竹筷轻轻捣动血液除去)的血液 5 毫升, 3000 转/分离心 10 分钟, 仔细吸出上层清液, 并弃去。沉淀用 0.9% 氯化钠溶液洗涤, 在洗涤时小心搅动勿使红细胞破裂, 然后离心去除清洗液, 如此反复洗涤 4~5 次。将清洗净的红细胞移入三角瓶中, 在通风柜中缓慢通入煤气 10~20 分钟(在缺乏煤气设备条件时, 可采用甲酸和硫酸反应生成一氧化碳), 使形成稳定的碳氧血红蛋白。

## 2. 血红蛋白的制备

在上述制备好的红血球中加入等体积的乙醚和水的混合物〔乙醚:水=1:1(V/V)〕,使红血球充分溶血。3000 转/分离心 10 分钟,小心吸取中层红色的血红蛋白,弃去下层杂质和上层乙醚及乙醚底部的油状残渣。吸出的血红蛋白放在透析袋中,对蒸馏水透析 24 小时,直到乙醚气味除净。

## 3. 珠蛋白的制备

将上述透析好的血红蛋白转移到三角瓶中,加入 10 倍体积的酸性丙酮,经激烈振荡 15 分钟后有大量沉淀产生,然后经布氏漏斗抽滤,沉淀用少量丙酮洗涤三次,去除棕红色的血红素,即可获得粉末状的白色珠蛋白,经干燥后称重。

## 4. DNP-珠蛋白的制备

称取珠蛋白 100 毫克,放在离心管内,加 1 毫升 10% 碳酸氢钠并搅拌溶解, pH 调至 8.5~9.0 再加入 2.5% FDNB 乙醇溶液 3 毫升,立即用橡皮塞塞紧管口,试管外用黑色纸包裹,经激烈振荡 15 分钟,即有黄色 DNP-珠蛋白沉淀生成,继续维持 pH 在 8.5~9.0 之间,并间歇振荡,45 分钟后离心,弃去上清液,沉淀用水洗涤二次(每次用 5 毫升),乙醇洗二次,最后用乙醚洗二次(每次用 3 毫升),经抽滤后得到草绿色的粉末状 DNP-珠蛋白。

## 5. DNP-珠蛋白的水解

称取上述 DNP-珠蛋白 50 毫克,放在小试管中,加入 3 毫升 5.7N 盐酸,将试管封成安瓿,150~160°C 烘箱中水解 2 小时(或 110°C 水解 16~24 小时)。

## 6. DNP-氨基酸提取

打开 DNP-珠蛋白的水解管,取出水解液放在 25 毫升的分液漏斗中,用 45 毫升乙醚分三次提取,合并乙醚抽提液,置



于 100 毫升分液漏斗中,用 5 毫升水洗涤二次,然后将分离的乙醚层放入灯泡瓶,经减压抽气去除乙醚,剩下的黄色物(含有少量水分)用 0.2 毫升丙酮溶解,此即为 DNP-氨基酸。

### 7. DNP-氨基酸的纸层析鉴定

取 10×22 厘米的滤纸一张,在距纸边 2.5 厘米处划一基线,并取三点,然后用毛细管分别吸取 DNP-缬氨酸、DNP-NH<sub>2</sub> 和 DNP-末端氨基酸点样,点样斑点干燥后放在盛有 0.2M 磷酸缓冲液(pH6.0)的层析缸中层析 1~2 小时,层析结束后取出滤纸晾干,观察结果,即可看到 DNP-氨基酸的黄色斑点(如果层析滤纸用浓盐酸熏一下,在二硝基氟苯的斑点上 5 分钟后黄色会褪去,而 DNP-氨基酸斑点不会褪去),根据 DNP-氨基酸的 R<sub>f</sub> 值和标准 DNP-缬氨酸 R<sub>f</sub> 值对比可以知道珠蛋白的 N-末端氨基酸。在 DNP 化过程中,若有铵离子存在会产生 DNP-NH<sub>2</sub>,因此用氢氧化铵与 FDNB 作用形成 DNP-NH<sub>2</sub>,在层析时作为对照点样。

## 29. 葡聚糖凝胶层析特性<sup>[12,16]</sup>

### 一、目的

掌握葡聚糖凝胶的特性及凝胶过滤的原理和方法。

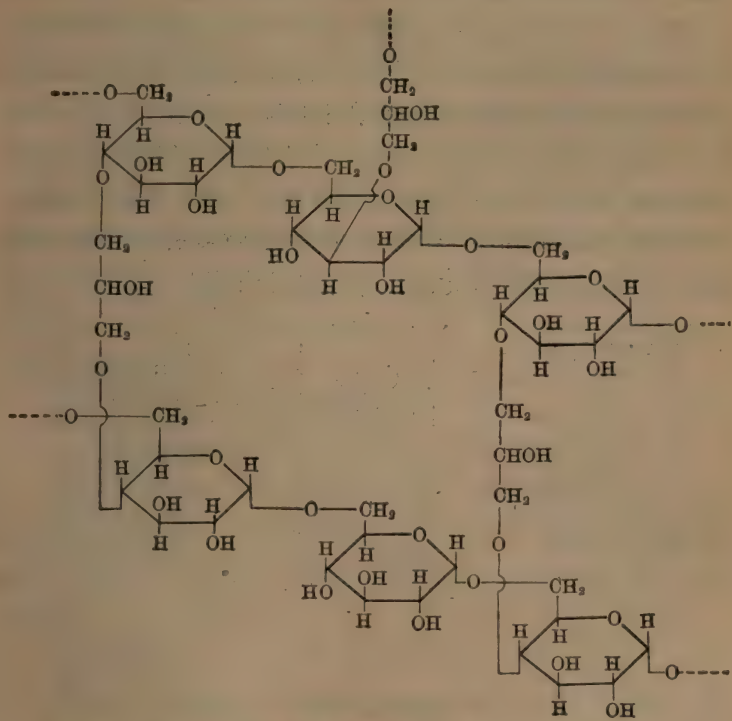
### 二、原理

凝胶过滤是广泛应用于蛋白质、酶、核酸等生物高分子的分离分析的有效方法之一,它是以被分离物质的分子量差异为基础的一种层析方法。此类层析的固相载体是具有分子筛性质的凝胶。目前使用较多的是具有各种孔径范围的葡聚糖凝胶(商品名为 Sephadex),聚丙烯酰胺凝胶(商品名为 Bio-gel)以及琼脂糖凝胶(商品名为 Sepharose)。此外还有这些凝胶的各类衍生物,此处不一一例举。本实验以葡聚糖凝胶

为例学习凝胶过滤的一般原理及方法。

葡聚糖凝胶是由一定平均分子量的葡聚糖(右旋糖苷)和甘油基以醚桥(—O—CH<sub>2</sub>—CH—CH<sub>2</sub>—O—)形式相互交联

形成三维空间的网状结构而组成,是一种水不溶性物质。通过控制交联剂环氧氯丙烷和葡聚糖的配比以及交联时的反应条件可控制交联度而获得具有不同“网眼”的凝胶。“网眼”的大小决定了被分离物质能够自由出入凝胶内部的分子量范



交联葡聚糖的化学结构

围。它们可分离的分子量从几百到数十万不等。

由于凝胶骨架中的多糖链含有大量 OH 基, 因此凝胶具有很强的亲水性, 能在水和电解质溶液中膨胀。凝胶的交联度愈大, 孔径愈小, 吸水量少, 随之膨胀度也就愈小; 反之若凝胶交联度愈小, 孔径愈大, 吸水量大, 因而膨胀度也愈大。不同型号 of 交联葡聚糖用 G 表示(如 G-25, G-100 等), G 后面的数字为凝胶的吸水量(毫升水/克干胶)乘以 10 得到的数, 如 G-25 即表示此型号凝胶吸水量是 2.5 毫升/克干胶。各种型号交联葡聚糖的主要物理性质见附录 6。

进行工作时一般根据欲分离物质的大小及工作目的来选择合适的葡聚糖凝胶装层析柱。待分离的物质通过此柱时, 它们相互之间由于分子量大小各不相同以及在固定相上的阻滞作用的差异而在柱中以不同的速率移动。分子量大于允许进入凝胶“网眼”范围的物质完全被凝胶排阻, 不能进入凝胶颗粒内部, 阻滞作用小, 随着溶剂在凝胶颗粒之间流动, 因此流程短, 移动速度快而先流出层析柱; 分子量小的物质可完全

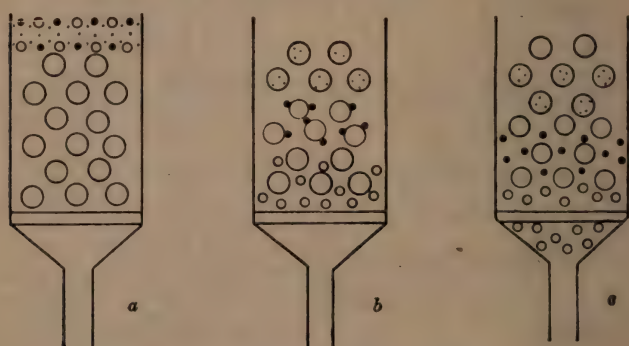


图 17 凝胶层析简单原理示意图

● 凝胶; ○ 大分子; ● 中等分子; · 小分子

渗入凝胶颗粒,阻滞作用大,流程长,移动速度慢,从层析柱中流出就较晚。若物质分子量介于完全排阻物质和完全渗入凝胶物质的分子量之间,则在前二者之间从柱中流出。由此就可达到分离的目的。

本实验采用葡聚糖凝胶 G-50 作为固相载体,它适用于分子量范围在 1500~30000 之间的多肽与蛋白质的分离。当蓝色葡聚糖 2000(分子量 200 万以上,蓝色),细胞色素 c(分子量 12400,红色)和 DNP-甘氨酸(分子量 255,黄色)的混合物流经层析柱时,三种有色物质的分级分离明显可见。蓝色葡聚糖因全排阻而首先流出,细胞色素 c 部分渗入凝胶颗粒内部较次流出,DNP-甘氨酸则完全渗入凝胶内部而最后流出。通过作洗脱曲线可以清楚地表示出葡聚糖凝胶 G-50 对这三种物质的分离效果。

鉴于凝胶是一种不带电荷的隋性物质,本身不会与被分离物质相互作用,因而分离效果好,重复性高。凝胶过滤所需仪器设备简单,操作简便,每次样品洗脱完毕则已经再生可反复使用。这些优点使凝胶过滤法应用广泛,成为一种前途广阔的分​​离分析方法。

### 三、实验材料,仪器和试剂

#### 1. 实验材料

葡聚糖凝胶 G-50(Sephadex G-50, 28~80 微米, Pharmacia 进口分装);蓝色葡聚糖 2000(Pharmacia);细胞色素 c(生化试剂,上海酵母厂);DNP-甘氨酸(生化试剂,上海东风试剂厂)。

#### 2. 仪器

吸管 1 毫升( $\times 1$ );层析柱 1 $\times$ 20 厘米( $\times 1$ );刻度离心管( $\times 4$ );小试管 1 $\times$ 7.5 厘米( $\times 40$ );烧杯 5 毫升( $\times 1$ ), 100 毫



升( $\times 2$ ); 灯泡瓶( $\times 1$ ); 滴管; 玻棒。

分析天平; 台秤; 秒表; 水浴锅。

### 3. 试剂

洗脱液——0.05M Tris-盐酸, pH7.5, 0.1M 氯化钾溶液: 称取 12.12 克 Tris (三羟甲基氨基甲烷), 15 克氯化钾, 先用少量水溶解, 再加入 6.67 毫升浓盐酸, 以蒸馏水定容到 2000 毫升。

## 四、操作步骤

### 1. 凝胶溶胀

称取 3 克 SephadexG-50 加入到 50 毫升蒸馏水内, 室温溶胀 6 小时或沸水浴溶胀 2 小时, 一般常采用后一种方法。沸水浴溶胀不但节约时间, 而且可消毒, 除去凝胶中污染的细菌和排除凝胶内的气泡。用倾泌法除去凝胶上层水及细小颗粒, 反复以蒸馏水洗涤直至无细小颗粒止(细小颗粒的存在会影响层析的流速), 凝胶以洗脱液洗涤几次后放在灯泡瓶内, 水泵抽气除去气泡。凝胶保存在洗脱液内。

### 2. 装柱

洗净的层析柱保持垂直位置, 柱内装放洗脱液, 排除层析柱滤板下的空气, 关闭出口, 柱内留下约 10 毫升洗脱液。加入搅拌均匀的葡聚糖凝胶 G-50 的浆液, 打开柱底部出口, 调节流速 0.3 毫升/分。凝胶随柱内溶液慢慢流下而均匀沉降到层析柱底部, 不断补入凝胶浆直到凝胶床高 15 厘米止, 床面上保持有洗脱液。操作过程中注意不能让凝胶床表面露出液面, 并防止层析床内出现“纹路”。关闭出口。

### 3. 加样

称取蓝色葡聚糖 2000 0.5~1 毫克, 细胞色素 c 1.0~1.5 毫克, DNP-甘氨酸 0.2~0.3 毫克, 溶于 0.5 毫升洗脱液

中。

用滴管吸去凝胶床顶部大部分液体，打开出口使洗脱液恰流到床表面止，关闭出口。小心地把上述样品加于柱内成一薄层，切勿搅动床表面。打开出口使样品溶液渗入凝胶内并开始收集流出液计量体积。用 0.5~1 毫升洗脱液洗凝胶床表面二次，在尽量不稀释样品溶液同时使样品完全进入凝胶柱内，当液面降至床表面时，小心加入洗脱液保持不让凝胶床面露出液面。

#### 4. 洗脱与收集

调节洗脱液流速为 0.3 毫升/分。仔细观察样品在层析柱内的分离现象，收集并量取洗脱液体积，当达 4 毫升后，开始用刻度离心管每隔 0.3 毫升收集一管，用肉眼观察并以 -，+，++，+++ 符号记录三种物质洗脱液的颜色及深浅程度。

#### 5. 绘制洗脱曲线

以洗脱管数为横坐标，洗脱液的颜色强度 (-，+，++，+++ ) 为纵坐标 (相对指示出洗脱液内物质浓度的变化)，在坐标纸上作图，即得洗脱曲线。

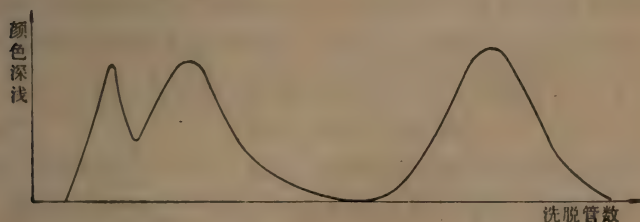


图 18 洗脱曲线

## 30. 蛋白质分子量测定(一)

### ——SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法<sup>[11,17,18]</sup>

#### 一、目的

学习 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,并用于测定蛋白质的分子量。

#### 二、原理

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳即是在聚丙烯酰胺凝胶系统中引进 SDS (十二烷基磺酸钠), 蛋白质在一定浓度的 SDS 溶液中, 与 SDS 分子按比例结合, SDS 能破坏蛋白质分子间以及与其他物质分子间的非共价键, 使蛋白质变性并失去原有的空间构型, 形成带负电荷的 SDS-蛋白质复合物。这种复合物由于结合了大量的 SDS, 使蛋白质丧失了原有的电荷状态, 形成仅保持原有分子大小为特征的负离子团块, 从而降低或消除了各种蛋白质分子之间天然的电荷差异。由于 SDS 与蛋白质的结合是按重量成比例的(当 SDS 浓度大于 1 毫克分子时, 大多数蛋白质以 1.4 克 SDS/克蛋白质的比例结合), 因此在进行电泳时, 蛋白质分子的迁移速度仅取决于分子大小。当蛋白质分子量在 12,000~165,000 之间时, 蛋白质的迁移率和分子量的对数呈直线关系, 符合下式:

$$\log MW = K - bX$$

式中, MW 为分子量, X 为迁移率, K、b 均为常数。若将已知分子量的标准蛋白质的迁移率对分子量的对数作图, 可获得一条标准曲线。未知蛋白质在相同条件下进行电泳, 根据它的电泳迁移率即可在标准曲线上求得分子量。有人对 37 种不同的已知分子量的多肽链进行测定, 获得较好的结果(见图 19)。

采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法来测蛋白质分子量时,必须完全打开二硫键,否则由于蛋白质分子结合 SDS 量较少,而使结果偏低,因此在用 SDS 处理样品同时往往用巯基乙醇处理。巯基乙醇是一种强还原剂,它使被还原的二硫键不易再氧化,从而使很多不溶性蛋白质溶解而与 SDS 定量结合。

采用本方法测定分子量快速,重复性高,精确度为  $\pm 10\%$ 。此外,要求的设备简单,样品微量,能适用于较广的分子量范围内样品的测定;用此法测定所得结果与其他理化方法得到的结果基本相符合,所以它是一种很有前途的方法。但是对于一些

电荷特殊、构型特殊、含碳水化合物、带有未还原的 SH 基的“不正常”蛋白质会出现迁移率偏低而分子量偏高的现象,对这类样品分子量的测定还需用其他测定方法作参照。

### 三、实验材料,仪器和试剂

#### 1. 实验材料

牛血清白蛋白(生化试剂,上海东风试剂厂);核糖核酸酶(生化试剂,上海东风试剂厂);细胞色素 c (生化试剂,上海酵

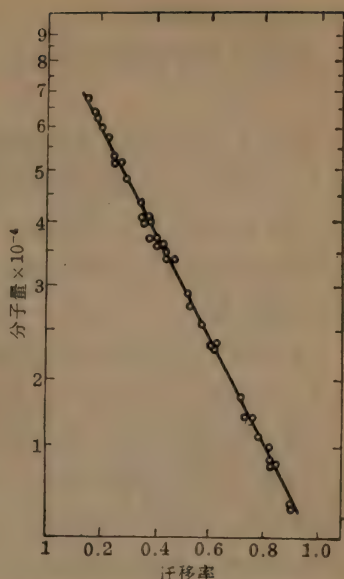


图 19 37种不同多肽链(分子量 11,000~70,000)用 SDS-凝胶电泳测其分子量图

蛋白质样品在 0.01M 磷酸钠缓冲液 pH7.0-1% SDS-1%  $\beta$ -巯基乙醇保温 37°C 2 小时。凝胶缓冲系统为 SDS-磷酸钠中性,10%凝胶



母厂);糜蛋白酶原。

待测分子量的蛋白质样品。

## 2. 仪器

玻璃管0.6×10厘米(×10);吸管0.1毫升(×1),1毫升(×1),2毫升(×1),10毫升(×2);具塞子试管(×5);试管1.5×15厘米(×10);烧杯50毫升(×1),100毫升(×1);微量进样器50微升(×5);灯泡瓶(×1);注射器及注射针(5号、9号);滴管;玻棒。

分析天平;电泳仪;圆盘电泳槽;洗耳球;尺;软木塞。

## 3. 试剂

凝胶缓冲液——0.2M磷酸-SDS缓冲液, pH7.0: 称磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 分析纯)8.7克, 磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 分析纯)51.6克, SDS(十二烷基磺酸钠, 需以乙醇重结晶\*)2克加蒸馏水定容到1000毫升。

电泳缓冲液——0.1M磷酸-SDS缓冲液, pH7.0: 取凝胶缓冲液以蒸馏水稀释一倍即成。

22.2%丙烯酰胺-0.6%甲撑双丙烯酰胺溶液: 22.2克丙烯酰胺, 0.6克甲撑双丙烯酰胺加水溶解, 定容到100毫升, 滤去不溶物, 装入棕色瓶贮冰箱。

过硫酸铵(分析纯)溶液: 临用前以蒸馏水配成1.5毫克/毫升的溶液。

处理蛋白样品缓冲液——0.01M磷酸缓冲液, pH7.0-1% SDS-1%巯基乙醇: 称取磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 分析纯)0.44克, 磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 分析纯)

---

\* SDS重结晶: 250克SDS加到4升95%乙醇中, 回流五小时。趁热用热水漏斗过滤, 滤液搅拌冷却到室温, 然后4℃下搅拌过夜。抽滤收集结晶, 尽可能抽干, 冷冻至完全干燥。

2.58 克, 以蒸馏水定容到 100 毫升配成  $0.1M$  pH7.0 磷酸缓冲液。处理蛋白前取此缓冲液 1 毫升, 加入 0.1 克 SDS, 0.1 毫升巯基乙醇, 加水至 10 毫升即成。

TEMED(四甲基乙二胺): 保持于冰箱内。

0.05% 溴酚蓝溶液: 2.5 毫克溴酚蓝加  $0.01M$  pH7.0 磷酸缓冲液到 5 毫升。

染色液: 0.25 克考马斯亮蓝 R 250 溶于 45.5 毫升甲醇(化学纯), 再加 9.2 毫升冰醋酸(化学纯), 以水补到 100 毫升, 用滤纸过滤除去不溶物。

脱色液: 50 毫升甲醇加 75 毫升冰醋酸, 补水到 1 升。

甘油。

#### 四、操作步骤

##### 1. 标准蛋白质样品的制备

分别称取标准蛋白质样品牛血清白蛋白(分子量 68000), 糜蛋白酶原(分子量 25700), 核糖核酸酶(分子量 13700)和细胞色素 c(分子量 11700) 0.5 毫克, 置于具塞小试管中, 加入 0.5 毫升处理蛋白样品缓冲液。100℃ 水浴中保温 2 分钟, 冷却后加 2 滴 0.05% 溴酚蓝溶液、4 滴甘油, 混合均匀, 保存于冰箱内。

##### 2. 10% 凝胶的制备

15 毫升凝胶缓冲液与 13.5 毫升丙烯酰胺-甲撑双丙烯酰胺溶液混和, 在灯泡瓶中用水泵抽气, 除去空气后, 再加入 1.5 毫升新鲜配制的 1.5 毫克/毫升过硫酸铵溶液以及 0.045 毫升 TEMED, 搅拌均匀即可装玻管。玻璃管必须预先用洗液浸泡并清洗干净, 烘干。它的一端用乳胶管与一根长 3 厘米, 直径与玻璃管外径相同的玻璃棒相接以达到封闭的目的。玻管垂直地放在架子上。将上述准备好的凝胶溶液用滴管加到玻

管内直至离上端 1 厘米处止。用一注射器通过注射针小心地加蒸馏水到每支玻管的凝胶溶液顶部，注意切勿搅动凝胶溶液。这一步骤保证了凝胶的聚合并形成平坦的凝胶表面。20~30 分钟后，水与凝胶之间出现明显的界面，表示凝胶已聚合，除去上层水。

### 3. 加样

把凝胶管放在电泳槽装置中，加电泳缓冲液到下槽，轻轻敲凝胶管除去凝胶与缓冲液界面中的气泡，同样加电泳缓冲液到上槽，使凝胶管上端空隙内充满缓冲液。用微量注射器吸取已处理好的蛋白质样品溶液 50 微升通过缓冲液加在凝胶表面上，由于样品比重大于缓冲液，因此在凝胶的顶部形成致密的一层。每种样品分别上样于二支凝胶上。

### 4. 电泳

把电源与电极接通，阴极在上槽，阳极在下槽。电泳在每支胶恒定 8 毫安电流下进行。电泳 4~5 小时后，指示染料进入凝胶  $3/4$  处即可结束电泳。

用装有长针头的注射器把水注入凝胶和管壁之间，使凝胶和管壁脱离，用洗耳球套住玻管的一头轻轻加压，凝胶从玻管内滑出。用尺量出每支凝胶长度和溴酚蓝区带中心移动的距离，作好记录。

### 5. 染色和脱色

将凝胶条分别装在各试管中，每支试管上注明是何种蛋白质样品。加入考马斯亮蓝 R250 染色液，覆没凝胶，染色 2~12 小时。

倒去染色液，凝胶以蒸馏水漂洗几次，然后加入洗脱液浸没凝胶进行扩散脱色。经常更换脱色液直至凝胶背景蓝色褪清，蛋白色带清晰为止。已用过的洗脱液可用活性炭脱色后

反复使用。

测量凝胶长度和蛋白质区带移动的距离。

## 6. 电泳迁移率的计算和标准曲线的制作

按下公式计算各蛋白质样品的迁移率：

$$\text{迁移率} = \frac{\text{蛋白质移动距离}}{\text{脱色后胶长}} \times \frac{\text{染色前胶长}}{\text{指示染料移动距离}}$$

样 品 (分子量)		染色前胶 长 (厘米)	脱色后胶 长 (厘米)	染料移动距 离 (厘米)	蛋 白 质 移动距离 (厘米)	迁移率	平均值
牛血清白蛋白 (68000)	1						
	2						
糜蛋白酶原 (25700)	1						
	2						
核糖核酸酶 (13700)	1						
	2						
细胞色素 c (11700)	1						
	2						

以各蛋白质样品迁移率作横坐标，蛋白质分子量的对数作纵坐标，在半对数坐标纸上作图可得一条测蛋白质分子量的标准曲线。

## 7. 待测样品的分子量测定

称取待测蛋白质样品0.5毫克，与标准蛋白质样品完全相同的步骤处理，电泳，染色和脱色，计算出相应的电泳迁移率。在标准曲线上可求出该样品的分子量。



## 31. 蛋白质分子量测定(二)

### ——葡聚糖凝胶过滤法<sup>[16,19]</sup>

#### 一、目的

学习用葡聚糖凝胶过滤法测定蛋白质的分子量。

#### 二、原理

葡聚糖凝胶 (Sephadex) 过滤法测定蛋白质分子量的原理,主要是依据这种凝胶具有分子筛作用,一定型号的凝胶具有大体上一定大小的孔径。在一定的凝胶柱内,凝胶孔隙所占的体积称为内水体积  $V_i$ , 凝胶颗粒间的自由空间所占的体积称为外水体积  $V_0$ 。当样品流经凝胶柱时,大于孔隙的大分子完全不渗入到凝胶内部,只需  $V_0$  体积的洗脱液便可将它们由一端洗脱到另一端,相反如果样品分子小于孔隙,则需要  $V_0 + V_i$  体积的洗脱液,才能将它们由一端洗脱到另一端。中等分子即分子的大小在上述二种极限之间,其所需洗脱液体积介于两者之间,  $V_e = V_0 + K_d V_i$  ( $0 < K_d < 1$ )。

$K_d$  为分配系数, 它表示一种物质在孔隙内的渗透程度,

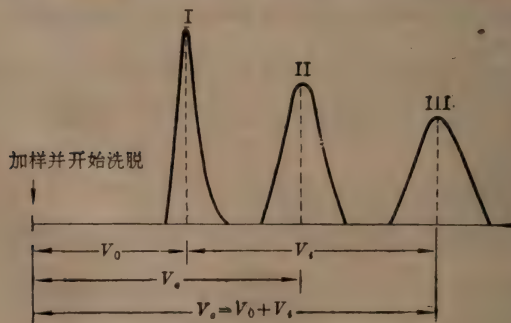


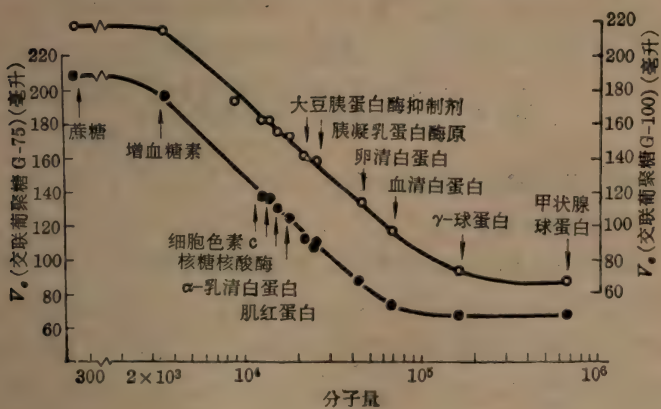
图 20 三个不同大小分子组份在凝胶过滤柱上的洗脱曲线示意图

相当于这种物质在孔隙内所占体积和孔隙总体积的比值,

$$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_i}.$$

如果假定蛋白质分子近于球形, 同时没有显著的水合作用, 则不同大小分子量的蛋白质, 进入凝胶筛孔的程度不同, 其洗脱体积取决于分子大小。当蛋白质分子量在 10,000~150,000 时, 蛋白质在葡聚糖凝胶柱上层析的洗脱体积和分子量的对数呈直线关系。若用已知分子量的标准蛋白质在一定型号葡聚糖凝胶柱上层析, 精确测其洗脱体积, 并以洗脱体积  $V_e$  对分子量的对数  $\log MW$  作图, 可获得一条标准曲线。未知分子量的蛋白质在相同条件下进行凝胶层析, 根据它的洗脱体积即可在标准曲线上求得分子量。

采用本方法测定分子量所需设备简单, 结果处理方便, 因此近十几年来应用较广泛, 但本方法仅适用于轴比相近的球状蛋白。对轴比大的纤维蛋白不适用; 对含糖量大于 5% 的



—图 21  $V_e$  对  $\log MW$  作图  
洗脱液 0.05M Tris-HCl, pH7.5; 0.1M KCl

糖蛋白因有较大的水合作用,测得的分子量偏高;对含铁蛋白质测定数据偏低。因此对这类样品分子量的测定还需要用其他测定方法作参考。

由于  $V_e$  和柱子的大小有关,如果用  $V_e/V_0$  对分子量的对数作图,同样可得到一个线性关系的标准曲线。由于  $V_e/V_0$  可以消除柱子大小和吸附效应的影响,因此是比较好的测定方法。

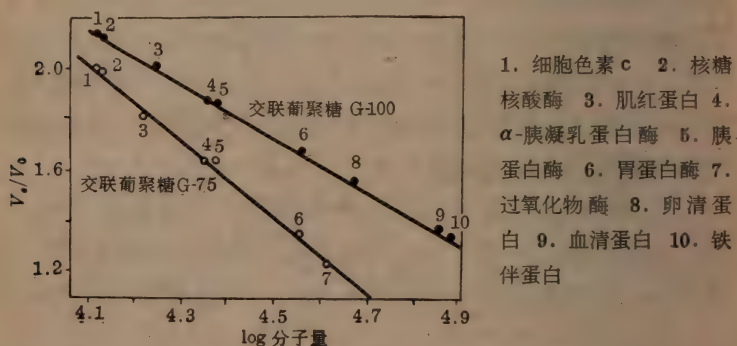


图 22  $V_e/V_0$  对  $\log MW$  作图

○—○ 1.2×184 厘米柱交联葡聚糖 G-75  
●—● 1.1×192 厘米柱交联葡聚糖 G-100

### 三、实验材料, 仪器和试剂

#### 1. 实验材料

牛血清白蛋白(生化试剂, 上海东风试剂厂); 卵清蛋白(生化试剂, 上海东风试剂厂); 细胞色素 c(生化试剂, 上海酵母厂); 核糖核酸酶(生化试剂, 上海东风试剂厂); 蓝色葡聚糖 2000 (Pharmacia); Sephadex G-100(Pharmacia, 进口分装); 滤纸。

#### 2. 仪器

吸管 1 毫升( $\times 1$ ); 称量瓶( $\times 4$ ); 层析柱  $2.6 \times 60$  厘米( $\times 1$ ); 洗脱液贮瓶 5000 毫升( $\times 1$ ); 烧杯 500 毫升( $\times 1$ ); 吸滤瓶(加橡皮塞)500 毫升( $\times 1$ ); 滴管; 搅棒。

751 型分光光度计或蛋白核酸检出仪 (上海闵行五金厂生产); 自动部分收集器。

### 3. 试剂

洗脱液—— $0.05M$  Tris-HCl 缓冲液, pH7.5,  $0.1M$  氯化钾溶液: 称取 12.12 克 Tris(三羟甲基氨基甲烷), 15 克氯化钾, 先用少量无离子水溶解, 再加入 6.67 毫升浓盐酸, 水定容至 2 升。

N-乙酰酪氨酸乙酯饱和溶液(以洗脱液饱和)。

## 四、操作步骤

### 1. 溶胀凝胶

称取交联葡聚糖 G-100 15 克, 加 500 毫升蒸馏水室温溶胀三天(或沸水浴中溶胀 5 小时)。待溶胀平衡后, 倾去上层清液, 包括细颗粒, 然后再放些蒸馏水搅拌, 静置使凝胶下沉, 再倾去上清液, 至无细颗粒为止。溶胀平衡和漂洗清的凝胶经减压抽气除去气泡, 即可准备装柱。

### 2. 装柱

取  $2.6 \times 60$  厘米层析柱一根, 底部用玻璃纤维或砂蕊滤板衬托, 并要求滤板下的体积(入口处和出口处的混合室)尽可能小, 以提高层析的灵敏度, 否则被分离的组份间重新混合的可能性就大, 其结果影响洗脱峰形, 出现拖尾现象, 降低分离效果。在砂蕊滤板上覆盖一张大小与柱的内径相同的快速滤纸片。将柱垂直装在铁架上, 然后在柱顶部通过橡皮塞连接一长颈漏斗, 漏斗颈的直径约为柱直径的一半。在柱中加水或洗脱液, 并将滤板下气泡赶净, 使支持滤板底部完全充



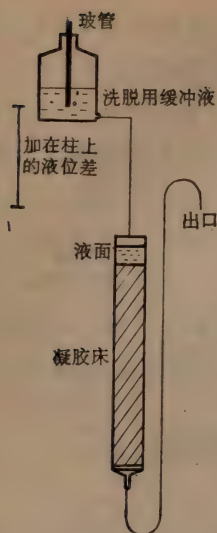


图 23 维持恒压装置图

满液体，然后将柱的出口关闭。把已经溶胀好的凝胶调成薄浆，从漏斗倒入柱内，胶粒逐渐扩散下沉，薄浆连续加入，当沉积的胶床达到 2~3 厘米高时，打开柱的出口，并注意控制操作压以均匀不变的流速直到胶装完为止。柱装好后，在床的上面盖上一张滤纸片，其大小略小于柱的内径，以便防止样品中一些不溶物质混入床中。再以洗脱液平衡层析柱，直至层析柱的床高不变为止。柱装得是否均匀，可用蓝色葡聚糖上柱检验，如果蓝色葡聚糖色带

均匀下移，说明柱子已装好，可以使用。

层析柱的流速可借操作压来控制，操作压即进出口液面的高度差(图 23)。凝胶床受操作压的影响极为明显。增加操作压虽能增加流速，但时间长久后，凝胶被压紧而使流速减

#### 各型 Sephadex 的最大承受压力

型 号	压力极限(毫米H <sub>2</sub> O)
G-200	10
G-150	15
G-100	35
G-75	50
G-50~G-10	>100

慢。各类凝胶能耐受的最大压力如表和图 24 所示。

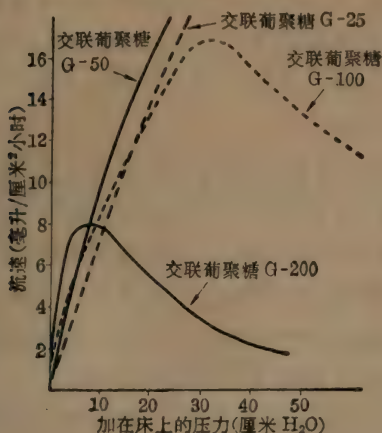


图 24 凝胶床上所加压力与洗脱速度的关系曲线

### 3. 上样

称取 0.5 毫克蓝色葡聚糖 2000 (分子量 200 万以上) 四份, 分别放在称量瓶中, 再称取标准蛋白牛血清白蛋白 (分子量 68000), 卵清蛋白 (分子量 43000), 核糖核酸酶 (分子量 13700), 细胞色素 c (分子量 11700) 各 10 毫克, 分别放在各称量瓶中, 各瓶中再加入 N-乙酰酪氨酸乙酯饱和溶液 0.5 毫升, 使混合物溶解后分别上柱。

样品上柱是实验成败的关键之一, 如果引起样品稀释或上柱不均匀, 会使区带扩散, 影响层析效果。上样时要尽量保持床表面稳定。先打开柱的出口, 待柱中洗脱液流至距床表面 1~2 毫米时, 关闭出口, 用滴管将溶解好的标准蛋白慢慢地小心加至床表面, 打开出口并开始计算流出液体积, 当样品渗入床中流至接近床表面 1 毫米时关闭出口, 同加样品时一

样小心地加入少量洗脱液,再打开柱的出口,使床表面的样品也全部渗入柱内。这时样品已经加好,在床表面再小心地加入洗脱液,使高出床表面 3~5 厘米,接上恒压洗脱瓶,调节操作压在 30 厘米以内。

#### 4. 收集和鉴定

将柱的出口处与部分收集器相连接(或与蛋白核酸检出仪相连)。开始层析,流出液分管收集(4毫升/管)和检出。收集液可分别在 751 型分光光度计 280 毫微米测出洗脱液吸收峰(或通过蛋白核酸检出仪描记)。记下各峰的洗脱体积。待 N-乙酰酪氨酸乙酯洗脱峰出现后,按同样方法进行第二个标准蛋白质样品的上柱,操作方法和步骤同前。

将各标准蛋白质测得的洗脱体积  $V_e$  对它们的分子量对数作图,获得一标准曲线。

待测蛋白质样品与标准蛋白质一样操作,并在同一柱上进行层析,根据其洗脱体积在标准曲线上查得它的分子量。

#### 5. 凝胶再生

实验后的胶床一般不必再生,但长时间使用后流速会减慢,主要是由于液流把胶床压紧的缘故,可以用水逆向洗涤或重新装柱恢复流速。流速的减慢也会因灰尘之类沉积在胶床上造成,在每次实验结束后把凝胶床顶部表面一层的胶去除,再补些新胶即可。

如果用过的凝胶需要长时间保存,则以干燥成干胶粒为宜。方法是先用水洗去游离的分子,再用 50% 乙醇漂洗,使胶粒中的水分尽量除去,经抽滤后放干燥器抽干,接近干燥时加 1~2 倍体积的 98% 乙醇,搅开干凝胶块,静止 0.5~1 小时,如此反复用乙醇处理 3~4 次,抽干后放 60~80℃ 干燥,可长期保存。

## 五、核 酸 化 学

### 32. 生物材料中总磷量测定——比色法

#### 一、目的

应用比色法测定生物材料中的总磷量。

#### 二、原理

生物体中有许多含磷化合物,如核酸、磷脂、ATP 等。磷的测定方法很多,有重量法、比浊法、比色法等。微量而准确的定磷方法常常是生物化学研究中必需的。比色法具有准确、微量、快速的特点,被广泛应用于生物化学工作中。

磷测定的原理是:有机含磷物质与浓硫酸(同时加入少量硫酸铜-硫酸钾催化剂)共热,使变成无机磷酸,此过程称为消化。在酸性条件下无机磷酸与钼酸根形成磷钼酸复离子,在还原剂作用下磷钼酸复离子被还原成深蓝色的钼蓝。磷含量愈高,则形成的钼蓝物质亦多,蓝色就愈深。应用分光光度计在 660 毫微米处可以测得此深蓝色溶液的光密度(OD)值,通过与已知浓度的标准磷溶液所测得的  $OD_{660}$  值相比较,就能得到所测样品中磷的含量。

核糖核酸(RNA)和脱氧核糖核酸(DNA)中都含磷酸。根据分析,纯的核酸含磷量为 9%。如从核酸样品中测到总磷量,就可计算出样品中核酸的量。例如某核酸样品测得磷为 1 毫克,那么此样品中就有 11 毫克核酸。

生物有机磷材料中有时含有无机磷杂质,要用定磷法来



测定该有机磷物质的量时,必须分别测定该样品的总磷量(样品经消化后所测得的含磷量)以及样品中的无机磷含量(样品不经消化而直接测得的含磷量)。将总磷量减去无机磷量即为该有机磷物质的含磷量。本实验测定 RNA 制品中的含磷量,由于样品纯度较高,不必测定无机磷含量,仅测总磷量就可以。

### 三、实验材料,仪器和试剂

#### 1. 实验材料

RNA 溶液: 在分析天平上精确称取 RNA (上海药用辅料厂),以  $0.1N$  氢氧化钠配成 5 毫克/毫升的溶液。

#### 2. 仪器

吸管 1 毫升( $\times 6$ ), 2 毫升( $\times 2$ ), 5 毫升( $\times 3$ ); 容量瓶 50 毫升( $\times 2$ ); 消化管 30 毫升( $\times 2$ ), 试管  $1.5 \times 15$  厘米( $\times 10$ )。

72 型分光光度计; 电热恒温水箱; 温度计。

#### 3. 试剂

磷酸盐标准溶液: 准确称取预先在  $105^{\circ}\text{C}$  下烘至恒重的磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 分析纯)0.4389 克, 以蒸馏水定容至 100 毫升即成含磷为 1 毫克/毫升的标准溶液。使用时将该液再稀释 100 倍, 此稀释液含磷量是 10 微克/毫升。

定磷试剂:  $6N$  硫酸: 水: 2.5% 钼酸铵: 10% 抗坏血酸 = 1: 2: 1: 1 (V/V)。此试剂要现用现配。配好时试剂应呈黄绿色或黄色, 如呈棕黄色或深绿色应弃去。

催化剂: 硫酸铜( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ): 硫酸钾( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) = 1: 4 (W/W), 研成细末备用。

浓硫酸(化学纯); 30% 过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )。

### 四、操作步骤

#### 1. 标准曲线的制作

按下表次序在各管内加入不同量的 10 微克/毫升的磷酸盐标准溶液和试剂,充分摇匀后于 45℃ 水浴保温 20 分钟。在分光光度计上测  $OD_{660}$  值。

管号	10微克/毫升标准磷酸盐溶液(毫升)	含磷量(微克)	水(毫升)	定磷试剂(毫升)	45℃水浴保温20分钟	$OD_{660}$
1	0	0	3.0	3.0		
2	0.5	5	2.5	3.0		
3	1.0	10	2.0	3.0		
4	1.5	15	1.5	3.0		
5	2.0	20	1.0	3.0		
6	2.5	25	0.5	3.0		

以各管的磷含量作横坐标,  $OD_{660}$  值为纵坐标作出标准曲线。

## 2. 核酸总磷量的测定

(1) 消化: 准确吸取 5 毫克/毫升的核糖核酸溶液 1 毫升于干燥的消化管中,加入少量催化剂(约 50 毫克),再加 1 毫升浓硫酸于消化炉上消化。待溶液呈黄色时,取出消化管,稍冷后加数滴 30% 过氧化氢,继续消化直至样品溶液成为无色或浅蓝色即为消化完全。样品消化完后,稍冷却,加入 1 毫升水,100℃ 加热片刻,使焦磷酸成为磷酸。

与被测样品消化同时,另作一个空白样品,即其他条件相同,仅在消化管内不放样品。

(2) 测定核糖核酸的总磷: 将已消化完毕的核酸样品和空白样品管溶液分别转移到 50 毫升的容量瓶中,并加水定容至 50 毫升。取此稀释好的溶液按下表次序进行测定。

管号	空白 (毫升)	核糖核酸消化稀释液 (毫升)	水 (毫升)	定磷试剂 (毫升)	45 °C 水浴 保温 20 分钟	OD <sub>660</sub> 值
1	1	—	2	3		
2	—	1	2	3		
3	—	1	2	3		
4	—	1	2	3		

## 五、结果计算

测定用核糖核酸(RNA)量为 W 微克, 从标准曲线查得 1 毫升核酸消化稀释液中含磷 y 微克, 则核酸中磷的百分含量为:

$$\text{含磷}\% = \frac{y \times 50 \times 100}{W}$$

式中: 50 为稀释倍数。

## 33. 核糖核酸定量测定

### ——改良苔黑酚法<sup>[20]</sup>

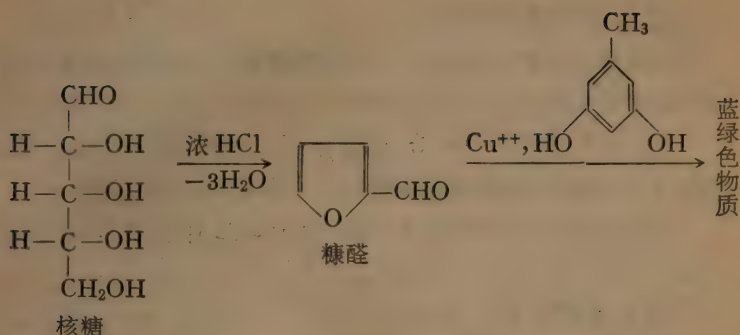
#### 一、目的

学习用定糖法测定核糖核酸(RNA)的含量。

#### 二、原理

RNA 与浓盐酸共热酸解生成嘧啶核苷酸、嘌呤碱基及核糖。核糖在浓酸中脱水环化成糠醛。它与苔黑酚 (3,5-二羟甲苯) 作用显示蓝绿色, 在670毫微米有最大吸收。本测定用铜离子代替苔黑酚法中的铁离子进行催化, 故称为改良苔黑酚法。它使反应灵敏度提高一倍以上。待测样品中若 RNA 在 5~50 微克/毫升之间, 则光密度与 RNA 的浓度成线性关系。

反应方程式如下:



样品中少量脱氧核糖核酸(DNA)存在对测定无干扰, 蛋白质、粘多糖则干扰测定。

由于测糖法只能测定 RNA 中与嘌呤连接的糖, 而不同来源的 RNA 含的嘌呤、嘧啶的比例各不相同, 因此用所测得的核糖量来换算各种 RNA 的含量是不正确的。最好用与被测物相同来源的纯化 RNA 作 RNA-核糖标准曲线, 然后通过此标准曲线查出被测物中 RNA 的含量。

### 三、实验材料, 仪器和试剂

#### 1. 实验材料

RNA 标准溶液: 在分析天平上精确称取纯 RNA (上海药用辅料厂), 用 0.001N NaOH 配成 50 微克/毫升的溶液。

待测 RNA 样品: 用 0.001N NaOH 将其配成 10~100 微克/毫升溶液。

#### 2. 仪器

吸管 1 毫升( $\times 2$ ), 2 毫升( $\times 5$ ); 试管 1.5 $\times$ 15 厘米( $\times 11$ )。

72 型分光光度计; 水浴锅。



### 3. 试剂

苔黑酚铜离子试剂:

甲、苔黑酚贮备溶液: 5 克苔黑酚溶于 10 毫升 95% 乙醇中, 溶液呈深红色。

乙、铜离子溶液: 0.75 克氯化铜 ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 溶于 500 毫升 12N 盐酸中, 溶液呈深黄色。

使用前 2 毫升苔黑酚贮备液加 100 毫升铜离子溶液混匀。

### 四、操作步骤

#### 1. 标准曲线的制作

按下表次序在 7 支试管内加入 50 微克/毫升的 RNA 标准溶液与试剂, 充分摇匀后在 100°C 水浴中保温 35 分钟, 流动水冷却。以 1 号管作空白, 在分光光度计上于 670 毫微米下测光密度(OD)值。

以  $\text{OD}_{670}$  为纵坐标, RNA 微克数为横坐标作出标准曲线。

管号	50微克/毫升 RNA标准液 (毫升)	RNA含量 (微克)	水 (毫升)	苔黑酚铜 离子试剂 (毫升)	100 °C 水浴保温 35分钟, 流动水冷却	$\text{OD}_{670}$
1	0	0	2	2		
2	0.2	10	1.8	2		
3	0.4	20	1.6	2		
4	0.8	40	1.2	2		
5	1.2	60	0.8	2		
6	1.6	80	0.4	2		
7	2.0	100	0	2		

## 2. 样品中 RNA 含量测定

吸取 2 毫升含 RNA 约 10~100 微克/毫升的待测样品溶液与 2 毫升苔黑酚铜离子溶液充分摇匀。同制作标准曲线同样步骤操作。670 毫微米下测得 OD 值，在标准曲线上可找出相应的 RNA 量。

样品测定需与制作标准曲线使用同一批试剂，同一台分光光度计。

管号	样品溶液 (毫升)	水 (毫升)	苔黑酚铜 离子试剂 (毫升)	100动 °C水 水冷却 保温 35分 钟， 流	OD <sub>670</sub>	RNA量 (微克)	平均RNA量 (微克)
1	0	2	2				
2	2	0	2				
3	2	0	2				
4	2	0	2				

## 五、结果计算

样品中 RNA 含量可以下式计算：

$$\text{RNA 含量} = \frac{y \times N}{2 \times W \times 10^3}$$

式中：y 为样品测得 OD<sub>670</sub> 值在标准曲线上查得的 RNA 微克数，

N 为所测样品稀释倍数，

W 为配制样品溶液时所用的样品毫克数，

2 为测定时取 2 毫升样品溶液。

例：某 RNA 制品 10 毫克，以 0.001N 氢氧化钠溶液溶解并定容到 250 毫升。取 2 毫升此 RNA 溶液按上法测得 OD<sub>670</sub> = 0.450，查标准曲线得 RNA 为 67 微克，故此样品中

RNA 含量为:

$$\frac{67 \text{ 微克} \times 250 \text{ 毫升}}{2 \text{ 毫升} \times 10 \text{ 毫克} \times 10^3} \times 100\% = 83.75\%$$

### 34. 脱氧核糖核酸定量测定

#### ——改良二苯胺法<sup>[21]</sup>

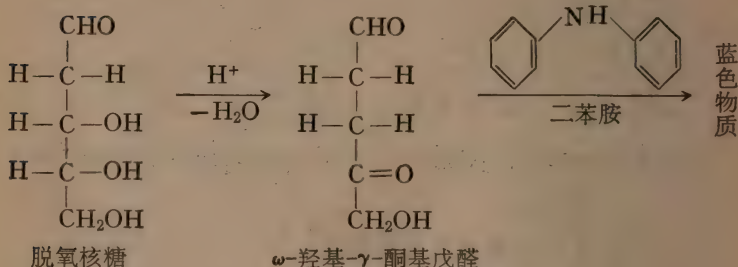
##### 一、目的

学习用定糖法测定脱氧核糖核酸(DNA)的含量。

##### 二、原理

在强酸环境下加热, 可以使 DNA 中嘌呤碱与脱氧核糖间的糖苷键断裂。因而 DNA 酸解后生成嘌呤碱基、脱氧核糖和脱氧嘧啶核苷酸。脱氧核糖在酸性条件下脱水生成  $\omega$ -羟基- $\gamma$ -酮基戊醛, 后者与二苯胺作用后显示蓝色, 在 595 毫微米有最大吸收。

反应方程式如下:



用二苯胺法测定 DNA 含量时灵敏度不高, 待测样品中 DNA 含量若低于 50 微克/毫升就难以测定。如用乙醛增加二苯胺法测 DNA 的发色量, 并用乙酸戊酯把反应中形成的蓝色产物抽提到有机溶剂相内, 如此进行测定灵敏度显著提

高。按此改良二苯胺法,待测样品中 DNA 含量在 10~150 微克/毫升范围内,光密度与 DNA 量成正比关系。

样品中含少量 RNA 不影响测定,而蛋白质、多种糖类及其衍生物、芳香醛、羟基醛亦能与二苯胺形成各种有色物质,故干扰测定。

### 三、实验材料,仪器和试剂

#### 1. 实验材料

DNA 标准溶液: 于分析天平上精确称取纯的鱼精 DNA (上海牛奶公司综合加工厂),并以水配成 100 微克/毫升的溶液(DNA 在水内较难溶,可隔夜配制)。

待测 DNA: 以水配成约 50 微克/毫升的溶液。

#### 2. 仪器

吸管 0.2 毫升( $\times 1$ ), 1 毫升( $\times 2$ ), 2 毫升( $\times 5$ ), 5 毫升( $\times 1$ ); 试管  $1.5 \times 15$  厘米( $\times 11$ ); 滴管。

72 型分光光度计; 电热恒温水浴箱; 温度计。

#### 3. 试剂

4% 二苯胺冰醋酸溶液: 20 克二苯胺(分析纯)加少量冰醋酸(分析纯)微热至全部溶解后,再以冰醋酸定容到 500 毫升,只限当天使用。

0.16% 乙醛水溶液: 取 40% 乙醛 0.4 毫升,加水至 100 毫升。

20% 过氯酸: 71.4 毫升 70% 过氯酸( $\text{HClO}_4$ , 分析纯)加水至 250 毫升。

乙酸戊酯(化学纯)或乙酸异戊酯(化学纯)。

### 四、操作步骤

#### 1. 标准曲线制作

按下表在各管内分别加入不同量的 100 微克/毫升 DNA



标准溶液，然后每管加水使体积均达 2 毫升。向各管加入 2 毫升 20% 过氯酸与 4 毫升 4% 二苯胺冰醋酸溶液，混匀后再加 0.2 毫升 0.16% 乙醛水溶液并充分摇匀。56℃ 保温一小时后，流动水冷却，并向各管反应混合液内加 2 毫升乙酸戊酯，试管加塞，剧烈振摇，使反应生成蓝色物质充分地抽提到乙酸戊酯相内。室温下放置 5~10 分钟使有机相与水相分层清楚。用滴管小心吸取上层有机相，使用 0.5 厘米光径比色杯于 595 毫微米处测光密度(OD)值。

管号	100微克/毫升 DNA 标准液 (毫升)	DNA量 (微克)	水 (毫升)	20% 过氯酸 (毫升)	4% 二苯胺冰醋酸溶液 (毫升)	0.16% 乙醛水溶液 (毫升)	56℃ 水浴保温一小时，水冷却	乙酸戊酯 (毫升)	充分抽提后，静止 5~10 分钟，取上层	OD <sub>595</sub>
1	0	0	2	2	4	0.2		2		
2	0.2	20	1.8	2	4	0.2		2		
3	0.4	40	1.6	2	4	0.2		2		
4	0.8	80	1.2	2	4	0.2		2		
5	1.0	100	1.0	2	4	0.2		2		
6	1.2	120	0.8	2	4	0.2		2		
7	1.4	140	0.6	2	4	0.2		2		

以 OD<sub>595</sub> 为纵坐标，DNA 微克数为横坐标，画出标准曲线。

## 2. 样品中 DNA 含量测定

吸取每毫升约含 50 微克 DNA 的待测样品溶液 2 毫升，与制作标准曲线同样步骤操作。595 毫微米下测得 OD 值从标准曲线上可查出相应的 DNA 量。

样品测定需与制作标准曲线使用同一批试剂，同一台分

光光度计。

管号	样品溶液(毫升)	水(毫升)	20%过氯酸(毫升)	4% 二苯胺冰醋酸溶液(毫升)	0.16% 乙醛水溶液(毫升)	56℃ 水浴保温一小时, 水冷却。	乙酸酐(毫升)	取上层充分抽提后, 静置5~10分钟,	OD <sub>595</sub>	DNA量(微克)	平均DNA量(微克)
1	0	2	2	4	0.2		2				
2	2	0	2	4	0.2		2				
3	2	0	2	4	0.2		2				
4	2	0	2	4	0.2		2				

## 五、计算

按下公式计算:

$$\text{样品中 DNA 含量 \%} = \frac{y \times N}{2 \times W \times 10^3} \times 100\%$$

式中: y 为样品测得 OD<sub>595</sub> 值在标准曲线上查得的 DNA 微克数,

N 为所测样品稀释倍数,

W 为配制样品溶液时所用的样品毫克数,

2 为测定时取 2 毫升样品溶液。

## 35. 紫外吸收法测定核酸及核苷酸含量

### 一、目的

掌握应用紫外分光光度法来测定核酸及核苷酸含量的方法。

### 二、原理

核苷、核苷酸、核酸的组成成分中都含有嘌呤、嘧啶碱基, 这些碱基都具有共轭双键(—C=C—C=C—), 它能强烈吸收

250~280 毫微米波段的紫外光, 最大吸收值在 260 毫微米左右。在定性鉴定各核苷酸类物质时, 可测定它们在几个特定波长下的紫外吸收值, 然后根据其 OD 比值(250nm/260nm, 280 nm/260nm, 290nm/260nm)来判断为何种核苷酸。

单核苷酸紫外吸收光谱的比值

比 值	250nm/260nm		280nm/260nm		290nm/260nm	
pH	2.0	7.0	2.0	7.0	2.0	7.0
5'-胞嘧啶核苷酸	0.46	0.84	2.10	0.99	1.55	0.33
5'-腺嘌呤核苷酸	0.85	0.80	0.22	0.15	0.04	0.01
5'-尿嘧啶核苷酸	0.74	0.73	0.38	0.40	0.03	0.03
5'-鸟嘌呤核苷酸	1.22	1.15	0.68	0.68	0.40	0.28

若要定量测定核酸类物质, 可根据其在特定波长下(一般在 260毫微米)的紫外吸收值计算出含量。

由于核酸中的碱基在不同 pH 下发生互变异构, 同时在紫外吸收光谱性质上表现出差异, 因而碱基、核苷与核苷酸的克分子消光系数在不同波长处随 pH 的变化而不同, 所以在测定紫外光吸收比值与定量计算时均应固定 pH。

本实验采用常用的比消光系数法测定核酸及核苷酸混合物的量, 此外简介克分子消光系数法及克原子磷消光系数法。

紫外吸收法简便、快速、灵敏度高, 一般可达 3 微克/毫升核酸的水平。测定时可配制成 10~20 微克/毫升的浓度。在测定核酸粗制品时, 样品中的蛋白质及色素等其他具紫外吸收的杂质对测定有干扰, 大分子核酸在变性降解后有增色效应, 因此有时核酸的紫外吸收法测得的含量值略高于用定磷

法测得的值。

### 三、实验材料, 仪器和试剂

#### 1. 实验材料

待测核酸; 广范试纸 pH 1~12。

#### 2. 仪器

吸管 2 毫升( $\times 3$ ), 1 毫升( $\times 2$ ); 离心管( $\times 2$ ); 量筒 50 毫升( $\times 1$ ); 烧杯 50 毫升( $\times 1$ ); 容量瓶 50 毫升( $\times 1$ )、100 毫升( $\times 2$ ); 玻棒; 滴管。

分析天平; 离心机; 751型分光光度计。

#### 3. 试剂

过氯酸-钼酸铵沉淀剂: 0.25% 钼酸铵的 2.5% 过氯酸溶液。如配制 200 毫升, 在 193 毫升蒸馏水中加入 7 毫升 70% 过氯酸和 0.5 克钼酸铵。由于钼酸铵在 260 毫微米处有较大的吸收, 因此所测核酸样品在加入沉淀剂后, 上清液需稀释 100 倍后再测定 260 毫微米处光密度(OD)值。

5~6% 氨水: 25~30% 浓氨水以水稀释 5 倍。

### 四、操作步骤

1. 准确称取 RNA 制品 0.25 克, 先用少量蒸馏水调成糊状, 再加约 30 毫升蒸馏水, 用 5% 氨水调 pH 到 6 助溶。待 RNA 全部溶解后转移到容量瓶内, 以水定容至 50 毫升, 配成 5 毫克/毫升溶液。

2. 取二支离心管, 甲管加入 2 毫升浓度为 5 毫克/毫升 RNA 溶液和 2 毫升蒸馏水; 乙管内加 2 毫升浓度为 5 毫克/毫升 RNA 溶液, 再加 2 毫升过氯酸-钼酸铵沉淀剂以除去大分子 RNA (此乙管作测定空白管), 摇匀后在冰箱中放置 30 分钟使沉淀完全。

3. 甲、乙两管各以 3000 转/分, 离心 10 分钟, 分别吸取上



清液 1 毫升于二个容量瓶内,以蒸馏水定容到 100 毫升。

4. 上述甲、乙两稀释液于紫外分光光度计上以蒸馏水作空白对照测  $OD_{260}$  值。

### 5. 结果计算

样品中核酸量按下式计算:

$$\text{RNA (微克)} = \frac{\text{甲 } OD_{260} - \text{乙 } OD_{260}}{0.022} \times V_{\text{总}} \times D$$

式中: 0.022 为核酸的比消光系数, 是浓度为 1 微克/毫升的核酸水溶液 (pH 为中性) 在 260 毫微米波长处, 通过光径为 1 厘米时的光密度值。由于大分子核酸易发生变性, 此值也随着变性程度不同而异, 因此一般采用 0.022 计算得到的 RNA 量是一个近似值。

甲  $OD_{260}$  - 乙  $OD_{260}$ : 甲  $OD_{260}$  为被测 RNA 溶液在 260 毫微米处的总光密度值; 乙  $OD_{260}$  为被测 RNA 溶液加沉淀剂除去大分子 RNA 后在 260 毫微米处的光密度值。二者之差即为被测溶液中 RNA 的光密度值。

$V_{\text{总}}$ : 被测溶液总体积(毫升)。

D: 样品溶液测定时的稀释倍数。

若按操作步骤测得甲  $OD_{260}$  为 0.440, 乙  $OD_{260}$  为 0.010, 则 0.25 克样品中 RNA 含量如下计算:

$$\begin{aligned} \text{RNA 量} &= \frac{0.440 - 0.010}{0.022} \times 50 \times 200 = 195000 \text{ 微克} \\ &= 0.195 \text{ 克} \end{aligned}$$

因此该 RNA 制品纯度为:

$$\frac{0.195 \text{ 克}}{0.250 \text{ 克}} \times 100\% = 78.0\%$$

五、应用比消光系数法测定 RNA 降解后的 3'-或 5'-混

## 合核苷酸的量

样品于 260 毫微米处测得光密度 (OD) 值后可按下式计算混合核苷酸的量:

$$\frac{OD_{260}}{0.032} \times V_{\text{总}} \times D = (\text{微克})$$

式中: 0.032 为核苷酸的比消光系数, 即浓度为 1 微克/毫升的 3' 或 5'-混合核苷酸溶液在 260 毫微米波长处, 通过光径为 1 厘米时的光密度经验值。由于 RNA 降解后常含有少量核苷或其他色素, 它们也有紫外吸收, 故用此法测得的核苷酸量比定磷法高约 10~15%。

$V_{\text{总}}$  为被测样品溶液总体积 (毫升)。

$D$  为样品溶液测定时的稀释倍数。

## 六、应用克分子消光系数法测碱基、核苷、核苷酸的量

此法仅适用于碱基、核苷、核苷酸的定量测定。对于大分子核酸, 由于它的分子量很难准确测定, 无法配制克分子浓度溶液, 因此不能采用这种方法进行定量测定。

各种样品在与它相应的特定波长 (见附录八) 下测得 OD 值后, 即可对含量进行计算, 计算公式如下:

$$\frac{OD_{\lambda} \times M \times D \times V_{\text{总}}}{\epsilon_{\lambda}} = (\text{毫克})$$

式中:  $\epsilon_{\lambda}$  为被测碱基、核苷或核苷酸溶液于某一 pH 条件时, 在某一特定波长处的克分子消光系数 (见附录八);

$OD_{\lambda}$  为被测碱基、核苷或核苷酸溶液于某一 pH 条件时, 在某一特定波长处测得的光密度值;

$M$  为被测碱基、核苷或核苷酸的分子量;

$V_{\text{总}}$  为被测碱基、核苷或核苷酸样品溶液总体积

(毫升);

D 为样品溶液测定时的稀释倍数。

计算示例:

为了测定发酵液中腺嘌呤的含量,可取 20 微升腺嘌呤发酵液点样于层析滤纸上,经展层后,滤纸上的紫外吸收斑点剪下用 3 毫升 0.1N 盐酸洗脱。洗脱液经测定  $OD_{262}=1.00$ , 已知腺嘌呤分子量为 135, 在 0.1N 盐酸中  $\epsilon_{262}=13 \times 10^3$ , 则 20 微升发酵液中腺嘌呤含量(也即是 3 毫升洗脱液中腺嘌呤的含量)是:

$$\frac{1.00 \times 135 \times 3}{13 \times 10^3} = 0.031 \text{ 毫克}$$

每毫升发酵液中腺嘌呤含量为:

$$\frac{0.031 \text{ 毫克}}{0.02 \text{ 毫升}} = 1.55 \text{ 毫克/毫升}$$

### 七、克原子磷消光系数 $[\epsilon_{(p)}]$ 法

此法可用于衡量核酸样品天然状态的程度。在 pH7 时, 对于天然状态的 DNA, 若配成每升含 1 克原子磷的核酸溶液, 在 260 毫微米处通过 1 厘米光径时的紫外吸收值  $\epsilon_{(p)}$  在 6200~6600 范围内。在核酸发生变性降解时, 此数值增大, 因此可以从  $\epsilon_{(p)}$  值初步判断核酸的天然状态程度。

被测核酸样品溶液经定磷法测得克原子磷浓度, 再于紫外分光光度计中测得  $OD_{260}$  值, 即可按下式进行计算:

$$\epsilon_{(p)} = \frac{OD_{260}}{C \times L}$$

式中:  $OD_{260}$  为被测核酸溶液在 260 毫微米处的光密度值。C 为被测核酸溶液的克原子磷浓度 (可用定磷法测得)。

L 为比色杯光径(厘米)。

计算示例:

某 DNA 样品溶液, 经定磷法测定含磷量为 3.0 微克/毫升, 该溶液的  $OD_{260}=0.610$ , 比色杯的光径为 1 厘米, 计算此 DNA 样品  $\epsilon_{(p)}$ 。

此样品溶液克原子磷浓度为:

$$C = \frac{3.0 \times 10^3}{31 \times 10^6} = 0.096 \times 10^{-3}$$

则

$$\epsilon_{(p)} = \frac{0.610}{0.096 \times 10^{-3} \times 1} = 6350$$

结果说明该 DNA 样品未变性及降解, 天然状态程度很高。

## 36. 动物组织细胞内核酸(DNA 与 RNA) 含量测定

### I. 肝脏组织中 DNA 和 RNA 的分离

#### 一、目的

学习从新鲜的动物组织中分离 DNA 和 RNA 的方法。

#### 二、原理

要进行细胞内 DNA 和 RNA 的总量测定, 必须包括二个步骤:

(1) 一个并不需要保持核酸分子完整性的分离纯化步骤;

(2) 对于核酸中的三个组分之一(碱基、戊糖或脱氧戊糖、磷酸)进行定量测定。

为了获取组织细胞内的 DNA 和 RNA, 首先必须用适当



的方法将细胞破碎，使核酸处在易于抽提的状态，然后从脂质、蛋白质等物质中将核酸分离出来，再利用 DNA 与 RNA 的水解特性不同而使二者分开。

由于所采用的组织材料不同，细胞的性质以及影响核酸测定的杂质，如核苷酸类、多糖类及多聚磷酸类等的含量也不同，因此相应的破碎细胞和分离核酸的方法也各不相同，所以没有适合一切对象的、固定的分离方法。本实验中所采用的是在分离、测定动物组织（大白鼠肝脏）全部核酸时能够得到良好结果的常用分离方法——施密特-撒哈泽-昔莱德法 (Schmidt-Thannhauser-Schneider)，简称 STS 法。

### 三、实验材料、仪器和试剂

#### 1. 实验材料

大白鼠肝脏。

#### 2. 仪器

吸管 1 毫升( $\times 1$ )，2 毫升( $\times 1$ )，5 毫升( $\times 1$ )，10 毫升( $\times 2$ )；离心管( $\times 3$ )；试管  $3.0 \times 20$  厘米( $\times 3$ )；量筒 10 毫升( $\times 2$ )，50 毫升( $\times 1$ )；烧杯 50 毫升( $\times 1$ )；玻璃匀浆器( $\times 2$ )；注射器( $\times 1$ )；滴管；玻棒。

离心机；电热恒温水浴箱；冰浴；解剖台；镊子；剪刀。

#### 3. 试剂

20% 三氯醋酸(TCA)：称取 100 克三氯醋酸(分析纯)加蒸馏水至 500 毫升。

10% 三氯醋酸(TCA)：称取 50 克三氯醋酸(分析纯)加蒸馏水至 500 毫升。

5% 高氯酸(PCA)：7.1 毫升 70% 高氯酸( $\text{HClO}_4$ ，分析纯)加蒸馏水 92.9 毫升。

无水乙醇；氯仿；甲醇(2:1V/V)；乙醚；0.3N 氢氧化钾；

0.1N 盐酸; 6N 盐酸。

#### 四、操作步骤

##### 1. 组织磨碎和酸溶性杂质的去除

打空气针于大白鼠心脏, 大白鼠立即死亡。剖腹取出肝脏组织, 放入搁于冰浴中的小烧杯中。剪碎肝组织, 称取 1 克置于玻璃匀浆器中, 加入已预冷的蒸馏水 5 毫升, 研磨成匀浆。再加 5 毫升预冷的 20% TCA 溶液, 搅匀并转移到离心管内,  $0\sim4^{\circ}\text{C}$ , 3000 转/分离心 20 分钟, 上清液必须澄清, 弃去。沉淀物加 10 毫升预冷的 10% TCA 溶液, 搅匀,  $0\sim4^{\circ}\text{C}$ , 3000 转/分离心 20 分钟, 上清液澄清, 弃去。

##### 2. 脂质的去除

沉淀物加冷蒸馏水 1 毫升, 搅成糊状。用滴管缓慢加入 8~10 毫升预冷的无水乙醇, 成均匀悬浊液,  $0\sim4^{\circ}\text{C}$ , 于 3000 转/分离心 10 分钟, 弃去上清液。再加入 8~10 毫升预冷无水乙醇, 成均匀悬浊液,  $0\sim4^{\circ}\text{C}$ , 3000 转/分离心 10 分钟, 弃去上清液。

以上的操作宜在  $0\sim4^{\circ}\text{C}$  进行, 以后的操作可以在室温下进行。

向沉淀物中加 8~10 毫升氯仿: 甲醇(2:1V/V)溶液, 使成均匀悬浊液, 3000 转/分离心 10 分钟, 弃上层。此步骤重复进行一次。缓慢加入 8~10 毫升乙醚于沉淀物, 使成均匀悬浊液, 3000 转/分离心分离, 弃上层。此步骤再重复一次。把具沉淀物的离心管置于  $30\sim40^{\circ}\text{C}$  水浴中, 充分除去沉淀中的乙醚, 最后得淡黄色粉末。

##### 3. RNA 的分离

向淡黄色粉末状沉淀物中加入 0.3N 氢氧化钾溶液并完全转移到玻璃匀浆器中, 共加 0.3N 氢氧化钾 10 毫升, 在匀

浆器中将沉淀物磨碎成糊状。37°C水浴保温 90 分钟,液面有气泡逸出,此时沉淀物中的 RNA 已水解成为核苷酸(加入氢氧化钾后,如果呈均一的溶解状态,37°C水解 90 分钟就够了,否则可延长保温时间至 18 小时)。碱水解后,加 6*N* 盐酸 1.65 毫升,充分搅拌并转移至离心管内,冷却使沉淀完全,3000 转/分离心 15 分钟,上清液即是已水解成核苷酸的 RNA 部分,沉淀中则含 DNA 及蛋白质。沉淀再悬于 0.1*N* 盐酸 8.35 毫升中,离心分离之。合并上述二步所得上清液,并以 0.1*N* 盐酸定容至 20 毫升,此为 1 克新鲜肝组织中的 RNA 部分。置冰箱待测含量。

#### 4. DNA 的分离

抽提除去 RNA 的沉淀物悬浮于 20 毫升 5%高氯酸溶液中,95°C水浴保温 15 分钟后离心分离,取上清液并定容到 20 毫升即是 1 克新鲜肝组织中已降解的 DNA 部分。置冰箱待测含量。

## Ⅱ. 肝脏组织中 DNA 和 RNA 含量测定

### 一、目的

测定已分离到的大白鼠肝脏组织中 DNA 与 RNA 的含量。

### 二、原理

核酸的定量测定一般是利用其碱基、戊糖或脱氧戊糖以及磷酸这三种组份的各种性质和特殊反应来进行的。核酸分子中三个组份是以等分子比例存在的,即每一个嘌呤或嘧啶分子都是与 1 分子戊糖及 1 分子磷酸相连接的,因此测出其中任何一组份的量,即可求出核酸的量。

一般常用紫外吸收法测碱基的量,戊糖采用与苔黑酚的

呈色反应测定，脱氧戊糖则利用它与二苯胺产生颜色反应来测定，磷酸亦是用比色法进行测定。上述方法的原理分别见实验 35、33、34、32 有关测定方法。

根据上述各种方法测定用 STS 法分离得到的大白鼠肝组织的 RNA 与 DNA 的含量均为：每克新鲜肝组织含 8~9 毫克 RNA，2~3 毫克 DNA；RNA 与 DNA 的比值为 3.5 左右，回收率约达 70%。（在与测定样品同量的组织中加入已知量的 RNA 和 DNA，一般加入相当于组织中所含有的核酸的量，然后进行各项测定。通过与样品测定的结果相比较即可求出回收率。）

### 三、实验材料, 仪器和试剂

#### 1. 实验材料

大白鼠肝脏组织分离得到的 DNA 和 RNA 溶液。

标准 DNA 溶液(100 微克/毫升)；标准 RNA 溶液(50 微克/毫升)；标准磷酸盐溶液(10 微克/毫升)。

#### 2. 仪器

吸管 1 毫升( $\times 12$ )，2 毫升( $\times 7$ )，5 毫升( $\times 6$ )，10 毫升( $\times 2$ )；试管  $1.5 \times 15$  厘米( $\times 35$ )；消化管 30 毫升( $\times 3$ )；容量瓶 10 毫升( $\times 3$ )。

751 型分光光度计；72 型分光光度计；电热恒温水浴箱；水浴锅；消化炉；温度计。

#### 3. 试剂

5% 高氯酸溶液：7.1 毫升 70% 高氯酸( $\text{HClO}_4$ ，分析纯)加蒸馏水 92.9 毫升即成。

定糖法试剂：分别见实验 33 和 34 试剂部分。

定磷法试剂：见实验 32 试剂部分。

### 四、操作步骤



## 1. 紫外吸收法测 RNA 和 DNA 含量

(1) RNA 含量的测定: 取大白鼠肝脏组织的 RNA 分离部分 0.5 毫升于试管中, 加 5% 高氯酸 9.5 毫升, 摇匀。沸水浴中水解 15 分钟, 冷却后以 5% 高氯酸为空白在 751 型分光光度计上测  $OD_{260}$  值。

(2) DNA 含量的测定: 取大白鼠肝脏组织的 DNA 分离部分 1 毫升, 加 5% 高氯酸 4 毫升, 以 5% 高氯酸为空白测  $OD_{260}$  值。

RNA 和 DNA 溶液测得的结果以每毫升 10 微克核酸  $OD_{260}=0.286$  进行计算 (0.286 是通常从 STS 法得到的核酸部分所选用的消光系数)。即:  $OD_{260} \times 10 / 0.286 = \text{RNA 或 DNA 微克/毫升}$ 。

测定所用样品原液中核酸的含量按下式计算:

$$\text{RNA 微克/毫升} = \frac{OD_{260} \times 10 \times 10}{0.286 \times 0.5}$$

式中: 0.5 为测定时用 0.5 毫升 RNA 原液, 10 为测定溶液共 10 毫升,  $10/0.286$  为每毫升 1 微克核酸在 260 毫微米处的光密度值,  $OD_{260}$  为测定溶液在 260 毫微米处的光密度值。

$$\text{DNA 微克/毫升} = \frac{OD_{260} \times 10 \times 5}{0.286}$$

式中: 5 为测定溶液共 5 毫升, 其余同上式。

上述计算所得核酸原液的微克/毫升数分别乘以 20 (核酸原液总体积) 即得到核酸毫克/克肝组织。

样品	稀释倍数	$OD_{260}$	相当于核酸量 微克/毫升	原液中核酸 微克/毫升	核酸毫克/ 克肝组织
RNA	20				
DNA	5				

## 2. 定糖法测 RNA 和 DNA 含量

(1) RNA 含量的测定: 取大白鼠肝脏组织的 RNA 分离部分 0.5 毫升, 加 5% 高氯酸 9.5 毫升, 摇匀(稀释 20 倍)。吸取 1 毫升按改良苔黑酚法测定 RNA 的含量(具体的操作步骤详见实验 33)。最后根据稀释倍数计算每克新鲜肝组织中 RNA 的毫克数。

(2) DNA 含量的测定: 取定容至 20 毫升的大白鼠肝脏组织的 DNA 分离部分 1 毫升, 加 5% 高氯酸 2 毫升(稀释 3 倍), 摇匀。吸取 1 毫升按改良二苯胺法测定 DNA 的含量(具体操作步骤详见实验 34)。最后根据稀释倍数计算每克新鲜肝组织中 DNA 的毫克数。

## 3. 定磷法测 RNA 和 DNA 含量

### (1) RNA 与 DNA 样品的消化

取 RNA 分离部分原液 5 毫升, DNA 分离部分原液 10 毫升, 分别于消化管中。在消化炉上微火加热浓缩至 1 毫升左右, 冷却后加约 50 毫克催化剂, 1 毫升浓硫酸, 微火加热, 样品由褐色至淡黄色, 稍冷, 加 30% 过氧化氢二滴促进其氧化, 继续加热至溶液呈无色或浅蓝色为止。稍冷, 加 1 毫升水, 100°C 加热 10 分钟以分解消化过程中形成的焦磷酸。此外另取一只消化管作空白样品, 除不加样品外, 其余步骤同样品管一样。

消化液和空白均用蒸馏水定容至 10 毫升。

### (2) RNA 和 DNA 含量测定

取上述定容至 10 毫升的消化液 0.5 毫升, 按定磷法分别测定 RNA 与 DNA 的含磷量(操作步骤详见实验 32), 然后根据核酸中磷含量为 9% 计算出核酸的量。

## 37. 动物肝脏组织中核糖核酸的提取

### 一、目的

学习从动物组织中提取 RNA 的方法。

### 二、原理

要研究核酸的结构、功能及理化性质，首先必须提取核酸。核酸是一种具有生物活性的高分子聚合物，为得到高度聚合状态的天然核酸，分离过程中需用温和条件以免核酸降解，同时亦要防止核酸降解酶类的作用。

在低温下把组织匀浆，使细胞破碎释放出核蛋白。利用 DNA-核蛋白和 RNA-核蛋白在一定浓度的氯化钠溶液中溶解度不同的特点，以  $0.15M$  氯化钠溶液抽提出 RNA-核蛋白。再用酚作为蛋白质变性剂去除 RNA-核蛋白中的蛋白质，释放出 RNA。最后用乙醇作沉淀剂即得天然程度较高的 RNA 沉淀物。

### 三、实验材料, 仪器和试剂

#### 1. 实验材料

大白鼠; 纱布。

#### 2. 仪器

吸管 1 毫升( $\times 1$ ); 离心管 10 毫升( $\times 18$ ); 量筒 10 毫升( $\times 2$ ), 50 毫升( $\times 1$ ); 玻璃匀浆器( $\times 1$ ); 烧杯 50 毫升( $\times 3$ ); 细颈瓶 60 毫升( $\times 1$ ); 玻璃漏斗( $\times 1$ ); 滴管。

离心机; 电动搅拌器; 电热恒温水浴箱; 药物台秤; 钢精锅; 注射器; 解剖剪刀; 镊子。

#### 3. 试剂

SSC 溶液—— $0.15M$  氯化钠、 $0.015M$  柠檬酸三钠溶液 pH7.0; 8.77 克氯化钠, 4.41 克柠檬酸钠( $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ )

以蒸馏水定容到 1000 毫升。

5% 十二烷基磺酸钠(SDS) 溶液: 5 克 SDS 溶于 45% 乙醇中配成 100 毫升溶液。

水饱和酚: 新鲜重蒸酚以水饱和。

95% 乙醇-2% 醋酸钾: 2 克醋酸钾溶于 95% 乙醇中配成 100 毫升溶液。

95% 乙醇; 冰; 粗盐。

#### 四、操作步骤

##### 1. 取大白鼠肝脏

大白鼠饥饿过夜。在大白鼠心脏处打空气针后大白鼠立即死亡。解剖取出肝脏, 立即放在搁于冰盐浴上的小烧杯中。

##### 2. 匀浆

用冷 SSC 溶液洗去肝脏的血水, 倾去洗涤液。用不锈钢剪刀将肝脏剪成碎块, 称取 5 克放入玻璃匀浆器内, 加 10 毫升 SSC 溶液(按每克新鲜肝加 2 毫升 SSC 溶液计算), 匀浆 10 分钟。

##### 3. RNA-核蛋白的分离

匀浆液经纱布过滤在离心管中, 滤液以 3000 转/分离心 20 分钟。离心后分二层, 上层是 RNA-核蛋白; 下层为细胞核和细胞碎片。小心吸出上层溶液, 量取体积后倒入具磨口塞细颈瓶中。

##### 4. RNA-核蛋白的解聚

加 5% SDS 溶液于上述上层溶液内, 使 SDS 的最终浓度为 0.5% 左右, 室温下摇匀。

##### 5. 酚去蛋白

水饱和酚在 65°C 下预热, 加等体积水饱和酚于上述解聚溶液内。65°C 水浴中摇动 10 分钟, 移入冰浴内继续摇动 10



分钟, 3000 转/分离心 15 分钟。离心液分三层: 上层水相含 RNA, 中层为变性蛋白与少量 RNA, 下层是酚层。小心吸出上层水相, 再加等体积水饱和酚同上步骤抽提去蛋白。如此重复 2~3 次, 直至上下二相界面之间无蛋白为止。小心吸取上层水相溶液, 量取体积后置于烧杯内。

## 6. RNA 的沉淀

取 2.5 倍体积预冷的 95% 乙醇-2% 醋酸钾溶液, 加入上述去蛋白的 RNA 溶液内, RNA 沉淀并以 3000 转/分离心 15 分钟收集此沉淀。RNA 沉淀复溶于 SSC 溶液中 (此处 SSC 溶液体积不易过大, 否则影响下一步得率), 再用二倍体积 95% 冷乙醇沉淀 RNA, 离心收集 RNA。此 RNA 再溶于 SSC 溶液。

## 7. 含量及纯度测定

用紫外法、定磷法及改良苔黑酚法测 RNA 含量; 福林酚法测 RNA 中蛋白质含量 (具体方法详见各有关实验)。

计算每克新鲜大鼠肝脏内 RNA 的含量和提取所得 RNA 的纯度。

# 38. 脱氧核糖核酸(DNA)的提取<sup>[22,23]</sup>

## I. 动物组织中 DNA 的提取

### 一、目的

掌握从动物组织中提取脱氧核糖核酸的方法。

### 二、原理

利用脱氧核糖核蛋白和核糖核蛋白在电解质溶液中溶解度的显著不同, 使二者分离。在 0.15M 氯化钠溶液中脱氧核糖核蛋白的溶解度最低, 此时的溶解度相当于它在纯水中的溶解度的 1%; 而在 1M 氯化钠溶液中, 它的溶解度至少是在

水中的二倍。相反，核糖核蛋白能在  $0.15M$  氯化钠中溶解。利用这一点，可以使脱氧核糖核蛋白与核糖核蛋白分开。为抑制组织中的脱氧核糖核酸酶对 DNA 的降解作用，在氯化钠溶液中加入柠檬酸钠作为金属离子的络合剂，通常用  $0.15M$  氯化钠， $0.015M$  柠檬酸钠溶液，并称为 SSC 溶液。

使用阴离子去污剂十二烷基磺酸钠 (SDS) 可以使 DNA 从脱氧核糖核蛋白中解离出来，而蛋白质则变性沉淀从而得到 DNA。

### 三、实验材料, 仪器和试剂

#### 1. 实验材料

小牛胸腺。

#### 2. 仪器

量筒 10 毫升 ( $\times 1$ ), 100 毫升 ( $\times 3$ ); 烧杯 100 毫升 ( $\times 2$ ), 250 毫升 ( $\times 2$ ); 磨口试剂瓶 125 毫升 ( $\times 1$ ), 500 毫升 ( $\times 1$ ); 玻璃匀浆器 ( $\times 1$ ); 吸管 1 毫升 ( $\times 1$ ), 10 毫升 ( $\times 1$ ); 滴管; 玻棒。

离心机; 电动搅拌器; 药物台秤; 钢精锅; 剪刀; 镊子。

#### 3. 试剂

$1\times$  SSC 溶液—— $0.15M$  氯化钠、 $0.015M$  柠檬酸三钠溶液, pH7.0: 8.77 克氯化钠, 4.41 克柠檬酸钠 ( $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ ) 以蒸馏水定容到 1000 毫升;

$10\times$  SSC 溶液—— $1.5M$  氯化钠、 $0.15M$  柠檬酸三钠溶液, pH7.0: 87.7 克氯化钠, 44.1 克柠檬酸钠 ( $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ ) 以蒸馏水定容到 1000 毫升。

$0.1\times$  SSC 溶液:  $1\times$  SSC 溶液用蒸馏水稀释十倍即成。

$0.15M$  氯化钠- $0.1M$  乙二胺四乙酸钠 ( $Na_2$  EDTA), pH8: 8.77 克氯化钠 (分析纯), 37.2 克  $Na_2$  EDTA (分析纯)

溶于 800 毫升蒸馏水,以氢氧化钠调 pH 至 8 后定容到 1000 毫升。

5%十二烷基磺酸钠(SDS)溶液(W/V):5克 SDS 溶于 100 毫升 45%乙醇中。

氯仿-异戊醇:氯仿(分析纯):异戊醇(分析纯)=24:1 (V/V)。

95%乙醇;70%乙醇;氯化钠(分析纯);粗盐;冰。

#### 四、操作步骤

1. 称取 20 克新鲜的小牛胸腺,浸于预先在冰盐浴中冷却的  $1\times$ SSC 溶液中,除去脂肪、血块等杂质,再用预冷的  $1\times$ SSC 溶液反复洗涤数次,直至胸腺组织块无色为止。

2. 把洗净的胸腺组织块剪碎,加 100 毫升  $1\times$ SSC 溶液[胸腺: $1\times$ SSC $\approx 1:5$ (W/V)]。在玻璃匀浆器内匀浆直至细胞基本上破碎止。

3. 组织匀浆放在离心杯中,浸于冰盐浴内冷却后以 4000 转/分离心 10 分钟。弃去上清液,沉淀物中再加 2 倍体积的  $1\times$ SSC 溶液,搅匀,离心,弃上清液。如此再重复二次。

4. 将离心后所得沉淀悬于 5 倍体积的 pH8、0.15M 氯化钠-0.1M  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  溶液中。边搅拌边慢慢滴加 5%十二烷基磺酸钠溶液,直至 SDS 的最终浓度达 1%止,然后加入固体氯化钠使其最后浓度达 1M,继续搅拌 30~60 分钟以确保氯化钠全部溶解。

5. 上述混合溶液倒入磨口塞的试剂瓶内,加入同体积的氯仿-异戊醇,激烈摇荡 20 分钟,4000 转/分离心 30 分钟。小心吸取上层水相,记取体积后置于烧杯内,加入 2 倍体积预冷的 95%乙醇,用玻棒慢慢搅动, DNA 纤维绕于玻棒上并挤干,用 70%乙醇洗 DNA 纤维二次,再用 95%乙醇洗涤一次;

取出并挤干。

6. 所得 DNA 复溶于  $0.1 \times \text{SSC}$  溶液中, 以同体积氯仿-异戊醇重复去蛋白 2 次, 重复步骤 5, 最后得到的 DNA 溶于  $0.1 \times \text{SSC}$  溶液中, 溶解后再加入  $1/10$  体积的  $10 \times \text{SSC}$  溶液, 使成  $1 \times \text{SSC}$  溶液, 置冰箱保存。

7. 分别用紫外吸收法、定磷法、定糖法定量测定核酸含量, 用福林-酚试剂法测定制剂中蛋白质含量 (具体方法详见各有关实验)。计算所得 DNA 制品的纯度及小牛胸腺中 DNA 的含量。

## II. 细菌中 DNA 的提取

### 一、目的

掌握从细菌中分离提取 DNA 的方法。

### 二、原理

为了研究微生物的遗传特性, 根据人们的要求定向改造和培养微生物, 必须分离得到具有高度聚合状态的天然 DNA, 然后才能对它的生物活性、物理和化学特性进行研究。

细菌具有坚韧的细胞壁, 常采用溶菌酶分解细胞壁, 结合使用阴离子去垢剂十二烷基磺酸钠(SDS)使菌体进一步溶解而释放出核酸与蛋白质。此外, SDS 还可以抑制脱氧核糖核酸酶的作用并使一部分蛋白质变性。溶菌后得到的高粘度悬液在 pH8.2 的水饱和酚作用下, 可以保持 DNA 活性同时使蛋白有效地变性, 离心可除去变性蛋白。由于细菌细胞质中含有大量的 RNA, 为得到较纯的 DNA 可用核糖核酸酶处理样品使 RNA 降解而除去。最后用 95% 乙醇作沉淀剂就可以得到较纯的丝状 DNA 沉淀。

### 三、实验材料、仪器和试剂



### 1. 实验材料

枯草杆菌(*B. subtilis*)。

### 2. 仪器

吸管 1 毫升( $\times 2$ ), 5 毫升( $\times 1$ ); 试管  $1.5 \times 15$  厘米( $\times 1$ ); 刻度离心管 10 毫升( $\times 2$ ), 离心管 10 毫升( $\times 10$ ); 量筒 10 毫升( $\times 2$ ), 50 毫升( $\times 1$ ); 烧杯 50 毫升( $\times 2$ ); 细颈瓶 60 毫升( $\times 2$ ); 三角烧瓶 250 毫升( $\times 5$ ); 滴管; 玻棒。

离心机; 托盘式扭力天平; 电热恒温水浴箱; 钢精锅。

### 3. 试剂

肉汤培养基: 称取牛肉膏 5 克, 蛋白胨 10 克, 氯化钠 5 克, 加水到 1000 毫升, 以氢氧化钠调 pH7.2~7.5。

0.15M 氯化钠-0.1M 乙二胺四乙酸二钠 ( $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ) 溶液, pH8.0: 8.76 克氯化钠(分析纯), 37.2 克  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  加 800 毫升蒸馏水, 以氢氧化钠调 pH 到 8.0, 最后以蒸馏水定容到 1000 毫升。

0.1M 三羟甲基氨基甲烷 (Tris)-1% 十二烷基磺酸钠 (SDS)-1.0M 氯化钠缓冲液, pH9.0: 0.4M Tris (48.46 克/升) 溶液 125 毫升, 0.2N 盐酸 25 毫升, 29.2 克氯化钠和 5 克 SDS 混合并以蒸馏水定容到 500 毫升。

0.1M 氯化钠-0.01M 醋酸钠缓冲液, pH5.2: 0.01M 醋酸钠 ( $\text{NaAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 1.36 克/升) 溶液 79 毫升与 0.01M 醋酸 (冰醋酸, 0.57 毫升/升) 溶液 21 毫升混合, 加入 0.58 克氯化钠。

水饱和酚: 新鲜重蒸酚用水饱和后以 5N 氢氧化钠调 pH 到 8.2。

SSC 溶液: 0.15M 氯化钠-0.015M 柠檬酸三钠溶液, pH 7.0。

0.1×SSC 溶液：取 SSC 溶液以蒸馏水稀释 10 倍。

10×SSC 溶液：1.5M 氯化钠-0.15M 柠檬酸三钠溶液，pH7.0。

溶菌酶溶液：结晶溶菌酶（生化试剂，活力 20000±1000 单位，上海禽蛋二厂）以氯化钠-EDTA（pH8.0）溶液配成 2 毫克/毫升的酶溶液。

核糖核酸酶溶液：结晶牛胰核糖核酸酶（生化试剂，上海东风试剂厂）以 0.1M 氯化钠-0.01M 醋酸盐缓冲液（pH5.2）配成 2 毫克/毫升的酶液。使用前此酶液先在 80℃ 水浴中加热 10 分钟，使污染的脱氧核糖核酸酶失活。

95% 乙醇，70% 乙醇，80% 乙醇；干冰，冰；粗盐。

#### 四、操作步骤

##### 1. 枯草杆菌的培养

5 只 250 毫升三角瓶内分别放入 30 毫升肉汤培养基，15 磅灭菌 30 分钟，冷却后接种，37℃ 通气振荡培养 12~15 小时。

##### 2. 菌体的收集和洗涤

合并五瓶枯草杆菌培养液于离心杯中，冰盐浴中预冷，3000 转/分离心 20 分钟，弃去上清液。用 50 毫升预冷的氯化钠-EDTA（pH8.0）溶液洗涤菌体，3000 转/分离心 20 分钟，弃去上清液。

以少量氯化钠-EDTA（pH8.0）溶液将离心杯中的菌体完全转移到已称重的刻度离心管中，3000 转/分离心 20 分钟，小心吸去上清液后称重，计算出湿菌体重量。

##### 3. 溶菌

以湿菌体：溶菌酶=1:1（W/V）的比例加入 2 毫克/毫升溶菌酶溶液，搅匀后在 37℃ 水浴中保温 10~20 分钟，当菌液

变粘开始溶菌时取出,倒入 50 毫升烧杯中。迅速把此烧杯放在干冰中冷冻。按 1 克湿菌体加 8 毫升 Tris-SDS NaCl 缓冲液 (pH9.0) 的比例加入适量 Tris-SDS-NaCl 缓冲液到已冷冻的细胞中,用玻璃棒把冻块捣成悬浮液。在 60°C 水浴中使此悬浮液温热到完全融化。溶菌完成后得到粘稠状溶液。为确保溶菌完全,可重复干冰速冻与 60°C 融化这一步骤。

#### 4. 酚去蛋白

已溶菌的悬浮液置于磨口塞细颈瓶中,加入同体积的水饱和酚,4°C 下手摇 20 分钟,得到的乳浊液 3000 转/分离心 15 分钟。离心液分三层,最下层是酚层,中间为变性蛋白层,上层液相含有 DNA。小心吸出上层液相并量取体积。再加同体积的水饱和酚抽提除蛋白,如此反复 3~4 次,直到二液相界面上蛋白质沉淀消失。小心吸取上层水相并记取体积。

#### 5. DNA 的沉淀

上述 DNA 溶液倒入烧杯中,缓慢加入二倍于 DNA 溶液体积的预冷 95% 乙醇,用玻棒慢慢搅动,白色丝状 DNA 均绕于玻璃棒上。DNA 沉淀依次在 70%、80%、95% 乙醇中洗涤,挤压干。

在一试管中加 6~8 毫升 0.1×SSC 溶液,玻棒上的丝状 DNA 反绕脱下在试管中。待 DNA 完全溶解后补入 0.6~0.8 毫升 10×SSC 溶液,使成 DNA 的 SSC 溶液。

#### 6. 核糖核酸酶去 RNA

加已预处理的 2 毫克/毫升核糖核酸酶溶液到含 DNA 的溶液中,使此酶最终浓度为 50 微克/毫升,混合物于 37°C 下温育 30 分钟。消化物冷却后再与等体积水饱和酚混合,4°C 下摇动 10 分钟,3000 转/分离心 15 分钟后收集上层水相,记取体积。

## 7. DNA 的沉淀

重复步骤 5 的操作得 DNA 丝状沉淀。溶于适量  $0.1 \times$  SSC 溶液后以  $1/10$  体积  $10 \times$  SSC 溶液调节成  $1 \times$  SSC 的 DNA 溶液, 贮于冰箱。

## 8. 含量测定

分别用紫外吸收法、定糖法定量测定核酸含量; 福林-酚试剂法测定蛋白质含量(具体测定方法详见各有关实验)。

计算所得 DNA 的纯度及每克湿菌体中 DNA 的得率。

## 39. 从酵母中制备 5'-核苷酸<sup>[24~27]</sup>

核苷酸在工农业生产、医学实践以及科学研究中都有着重要的意义。目前我国核苷酸生产除了用微生物直接发酵外, 主要是结合综合利用, 用啤酒酵母、白地霉、谷氨酸菌体、青霉菌菌丝体、面包酵母等抽提核酸, 再经水解获得核苷酸。

本实验用面包酵母作材料, 制备 5'-核苷酸。具体包括五个方面, 即酵母核糖核酸的提制, 核糖核酸的酶解, 5'-核苷酸的定量测定, 单核苷酸的离子交换柱层析分离, 单核苷酸的纸电泳鉴定。

通过这一组实验, 要求了解核苷酸生产的一般过程及基本原理, 学习和掌握基本的实验技术。

### I. 酵母核糖核酸的提制

#### 一、目的

了解从酵母中提制 RNA 的方法。

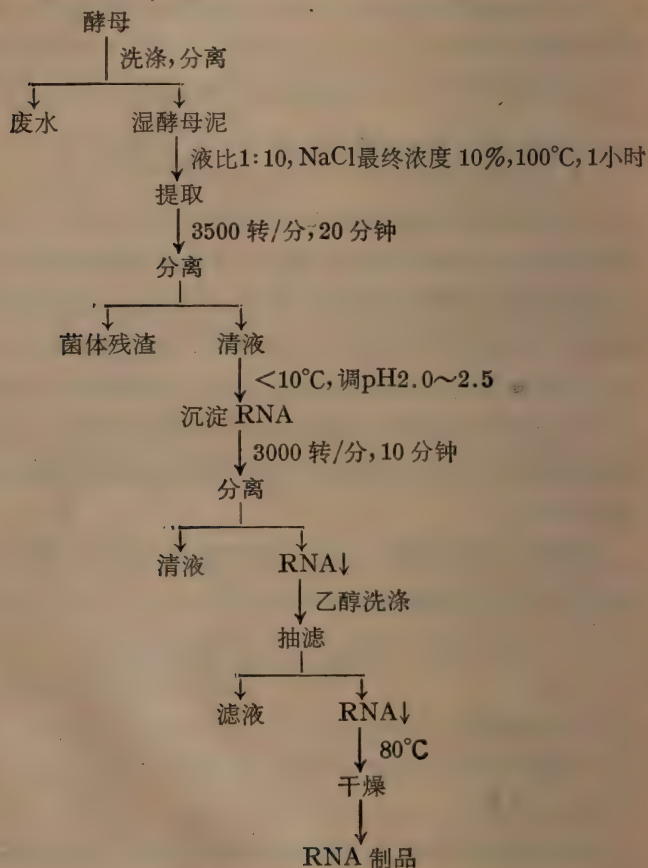
#### 二、原理

微生物是工业上大量生产核酸的原料, 其中以酵母尤为理想。这是因为酵母核酸中主要是 RNA ( $2.67 \sim 10.0\%$ ),



DNA 很少(0.03~0.516%), 菌体容易收集, RNA 也易于分离。此外, 抽提后的菌体蛋白质(占干燥菌体的 50%)还具有很高的利用价值。

RNA 提制过程是先使 RNA 从细胞中释放, 并使它和蛋白质分离, 然后将菌体除去, 再根据在等电点溶解度最小的性



酵母核糖核酸的提取过程

质,将 pH 调到 2.0~2.5,使 RNA 沉淀,进行离心收集。

提取方法有很多,在工业生产上常用的是稀碱法和浓盐法。前者利用稀碱使细胞壁溶解,这种方法抽提时间短,但 RNA 在此条件下不稳定,容易分解;后者是在加热条件下,利用高浓度的盐改变细胞膜的通透性,此法易掌握,产品颜色较好。

提取时应注意温度,避免在 20~70°C 之间停留时间太长,因为这是磷酸二酯酶和磷酸单酯酶作用活跃的温度范围,会使 RNA 因降解而不能收集到,利用加热至 90~100°C 使蛋白变性,破坏该类酶,有利于 RNA 的提取。

本实验采用浓盐法(10% NaCl),提制流程见上页。

### 三、实验材料,仪器和试剂

#### 1. 实验材料

压榨酵母(上海酵母厂);精密试纸 pH 0.5~5.0。

#### 2. 仪器

量筒 10 毫升( $\times 1$ );三角烧瓶 100 毫升( $\times 1$ );烧杯 250 毫升( $\times 1$ ), 100 毫升( $\times 1$ ), 50 毫升( $\times 1$ ), 10 毫升( $\times 1$ );布氏漏斗 40 毫米( $\times 1$ );吸滤瓶 125 毫升( $\times 1$ );表面皿 6 厘米( $\times 1$ );滴管及搅棒;干燥器;温度计 100°C。

离心机;水浴锅;药物台秤;烘箱;试管木夹。

#### 3. 试剂

NaCl(化学纯);6N HCl;95%乙醇(化学纯)。

### 四、操作步骤

#### 1. 酵母的洗涤与分离

取压榨酵母,低温下用水洗 3~4 次,离心得湿酵母泥,含水量一般为 75%左右。

#### 2. 提取

根据有关生产单位的经验，一般控制干酵母量与食盐水之比(液比)为 1:10, 盐最终浓度为 10%。

称取湿酵母泥 30 克于 100 毫升三角烧瓶内, 另在 100 毫升烧杯内称 7.5 克 NaCl 并溶于 52.5 毫升蒸馏水中, 将此 NaCl 溶液加到三角烧瓶中去, 使达最终浓度为 10% (30 克湿酵母泥含水量 =  $30 \times 75\% = 22.5$  克, 所以干酵母重量 =  $30 - 22.5 = 7.5$  克), 搅拌使匀, 然后于沸水浴中提取 1 小时。

### 3. 分离

将上述提取液取出, 用自来水冷却, 分装在离心管内, 以 3500 转/分离心 20 分钟, 使提取液及菌体残渣等分离。

### 4. 沉淀 RNA

离心得到的上清液, 倾于 50 毫升烧杯内, 并置于放有冰块的 250 毫升烧杯中冷却, 待溶液冷至  $10^{\circ}\text{C}$  以下时, 在搅拌下小心地用 6N HCl 调节 pH 至 2.0~2.5。随着 pH 下降, 溶液中白色沉淀逐渐增加, 到等电点时沉淀量最多(注意严格控制 pH)。调好后继续于冰水中静置 10 分钟, 使沉淀充分, 颗粒变大。

### 5. 洗涤及抽滤

上述悬浊液以 3000 转/分离心 10 分钟, 得到 RNA 沉淀。

将沉淀物放在 10 毫升小烧杯内, 用 95% 乙醇 5~10 毫升充分搅拌洗涤, 然后在布氏漏斗上用水泵进行抽气过滤, 再用 95% 乙醇 5~10 毫升淋洗 3 次。

由于 RNA 不溶于乙醇, 用乙醇洗涤不仅可脱水, 使沉淀物疏松, 便于过滤、干燥, 而且可除去可溶性的脂类及色素等杂质, 提高了制品的纯度。

### 6. 干燥

从布氏漏斗中取下沉淀物, 放在 6 厘米表面皿上, 铺成薄

层,置 80°C烘箱内干燥。

将干燥后的 RNA 制品称重,放在干燥器内,供 5'-磷酸二酯酶酶解用。

用紫外吸收法或戊糖显色法进行 RNA 制品的含量测定(见实验 33、35)并求出提取率:

$$\text{RNA 提取率}(\%) = \frac{\text{RNA 含量} \times \text{RNA 制品重(克)} \times 100}{\text{干酵母重(克)}}$$

## II. 核糖核酸的酶解

### 一、目的

通过 5'-磷酸二酯酶酶解实验,学习和掌握酶解的基本原理和方法。

### 二、原理

生产核苷酸的方法,主要有微生物直接发酵法(例如肌苷、肌苷酸的发酵生产),核酸的酸、碱和酶解法,此外还有提取法(从动植物组织中)、有机合成法。

碱水解主要生成 2'和 3'-核苷酸混合物,而酶解法则能专一地生成 3'或 5'-核苷酸。

目前 5'-核苷酸工业规模的生产,主要是通过微生物的 5'-磷酸二酯酶专一地降解酵母 RNA (图 25)。微生物发酵液往往是多种酶的混合物,因此在使用时要特别注意防止 5'-核苷酸的分解,

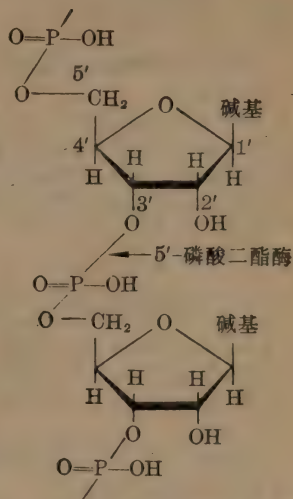


图 25 5'-磷酸二酯酶的作用位置



一般常用的桔青霉所产生的磷酸酯酶的最适 pH 约 5.0, 磷酸单酯酶的最适温度为 45°C, 而磷酸二酯酶即使在 65°C 以上仍有很强作用。因此通过控制酶解温度就可以防止单酯酶的分解, 并得到高的 5'-核苷酸产量。

本实验采用桔青霉(*Penicillium citrium*), 此菌经发酵培养能产生较强的 5'-磷酸二酯酶。

该酶最适 pH 为 5.2, 最适温度为 70~80°C (采用 75°C), 酶解时 RNA 浓度为 0.5%, 酶活力一般要求 100 单位/毫升以上 (紫外吸收法\*), 酶液量 10% (体积比), 酶解时间为 1.5 小时, 酶解率可达 80% 以上。

酶解流程见下页。

### 三、实验材料, 仪器和试剂

#### 1. 实验材料

---

\* 5'-磷酸二酯酶活力测定 (紫外吸收法):

##### 1. 试剂

0.5M 醋酸-醋酸钠(HAC-NaAC) 缓冲液(pH5.2): 称取醋酸钠 (NaAC·3H<sub>2</sub>O) 34.02 克, 用蒸馏水定容至 500 毫升; 另取 99.8% 冰乙酸 14.71 毫升, 用蒸馏水定容至 500 毫升。然后按 NaAC:HAC=7.90:2.10(V/V) 混合配成。

过氯酸-钼酸铵试剂 (配法见实验 35)。

2% RNA。

##### 2. 测定步骤

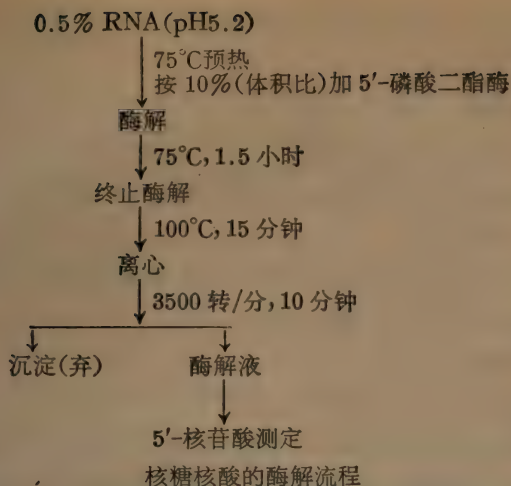
取甲、乙二试管, 分别加入 2% RNA 1 毫升, 0.5M HAC-NaAc 缓冲液 (pH 5.2) 0.5 毫升, 蒸馏水 0.4 毫升, 于 75°C 预热 5 分钟后, 向甲管中准确加入酶液 0.1 毫升, 75°C 反应 15 分钟, 然后加入过氯酸-钼酸铵试剂 2 毫升 (乙管作空白, 先加过氯酸-钼酸铵试剂 2 毫升, 后加酶液 0.1 毫升), 冷却后以 3000 转/分离心 15 分钟, 取上清液 0.1 毫升, 加蒸馏水 4.9 毫升, 在 260nm 读取光密度值。

##### 3. 计算

根据酶活力单位定义, 在上述条件下, 每分钟所形成的核苷酸量在 260nm 的光密度为 1.0 时为一个单位。

例如: 桔青霉发酵液在同一条件下测得  $OD_{260}=1.10$ , 则:

$$\text{酶活力} = \frac{1.10 \times 2 \times 100}{0.1 \times 15} = 167 \text{ 单位/毫升}$$



RNA: 从酵母中提制。

5'-磷酸二酯酶: 桔青霉发酵液 (上海药用辅料厂) 或酶粉 (见实验 55)。

精密试纸 pH 3.8~5.4。

## 2. 仪器

吸管 2 毫升 (×1); 量筒 25 毫升 (×1); 三角烧瓶 150 毫升 (×1); 烧杯 50 毫升 (×1); 试管 1.5 × 15 厘米 (×2); 离心管 10 毫升 (×2); 玻棒。

离心机; 电热恒温水浴箱; 水浴锅; 100°C 温度计。

## 3. 试剂

5% 氢氧化铵。

## 四、操作步骤

### 1. 0.5% RNA (pH 5.2) 的配制

取 RNA 制品 0.1 克于 50 毫升烧杯内, 先加少量蒸馏水湿润, 搅拌使溶, 再加蒸馏水补足至 20 毫升, 用 5%  $\text{NH}_4\text{OH}$

数滴调到 pH 5.2, 然后将此溶液转移到 150 毫升三角烧瓶内。

## 2. 酶解

将上述溶液于 75°C 恒温水浴中预热 5 分钟后, 加 5'-磷酸二酯酶酶液 2 毫升(按 10% 体积比), 75°C 酶解 1.5 小时。

## 3. 终止酶解

将上述反应液放置沸水浴中, 使迅速升温到 100°C, 并维持 15 分钟, 使酶失活终止酶解。

## 4. 离心

酶解液冷至室温, 转入离心管内, 以 3500 转/分, 离心 10 分钟。将酶解上清液放入干燥洁净的试管内, 经 5'-核苷酸含量测定后, 以备单核苷酸的离子交换树脂柱层析分离用。

# Ⅲ. 5'-核苷酸定量测定

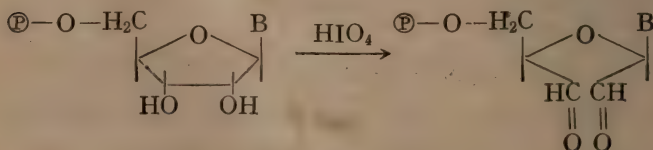
## ——过碘酸氧化法

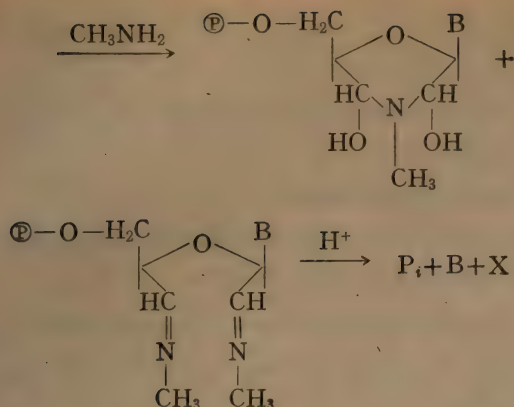
### 一、目的

用过碘酸氧化法测定 5'-磷酸二酯酶酶解液中 5'-核苷酸含量。

### 二、原理

5'-核苷酸核糖上的 2, 3 位羟基被过碘酸氧化断裂成双醛化合物后, 可为甲胺加成, 该加成物在酸性条件下定量地脱去 5'-磷酸, 反应式如下:





式中 $\textcircled{\text{P}}$ : 有机磷,  $\text{P}_i$ : 无机磷, B: 碱基, X: 结构未定物质。

无机磷与定磷试剂反应, 生成钼蓝, 可进行比色测定。所得之光密度值, 根据无机磷标准曲线查出磷含量后, 便可计算 5'-核苷酸的含量。

### 三、实验材料, 仪器和试剂

#### 1. 实验材料

RNA 的 5'-磷酸二酯酶酶解上清液。

#### 2. 仪器

吸管 5 毫升( $\times 2$ ), 1 毫升( $\times 2$ ), 0.5 毫升( $\times 3$ ), 0.1 毫升( $\times 1$ ); 容量瓶 50 毫升( $\times 1$ ); 试管  $1.5 \times 15$  厘米( $\times 11$ )。

72 型分光光度计; 电热恒温水浴箱; 洗耳球。

#### 3. 试剂

30% 乙二醇: 97% 乙二醇 155 毫升, 加蒸馏水至 500 毫升。

2M 甲胺: 30% 甲胺 50 毫升, 加蒸馏水定容至 250 毫升。

6% 过碘酸试剂: 3 克过碘酸钠( $\text{Na}_3\text{H}_2\text{IO}_6$ )加 5 毫升 6N



硫酸,加蒸馏水至 50 毫升;或 2.1 克  $\text{NaIO}_4$  加 5 毫升 6N 硫酸,加水至 50 毫升,保存于棕色瓶中。

10 微克/毫升标准磷溶液和定磷试剂:配法见实验 32。

#### 四、操作步骤

##### 1. 无机磷标准曲线的制作

按下表进行操作测定,注意加试剂顺序不可颠倒,于 72 型分光光度计 660 毫微米读取 OD 值。

管号	磷含量 (微克)	10 微克/毫升标准磷溶液 (毫升)	水 (毫升)	6% 过碘酸 (毫升)	作用一分钟	30% 乙二醇 (毫升)	2M 甲胺 (毫升)	45 °C 保温 10 分钟	定磷试剂 (毫升)	45 °C 发色 20 分钟	OD <sub>660</sub>
1	0	0	2.0	0.1		0.4	0.5		3		
2	2	0.2	1.8	0.1		0.4	0.5		3		
3	4	0.4	1.6	0.1		0.4	0.5		3		
4	6	0.6	1.4	0.1		0.4	0.5		3		
5	8	0.8	1.2	0.1		0.4	0.5		3		
6	10	1.0	1.0	0.1		0.4	0.5		3		

以含磷量(微克)为横坐标,  $\text{OD}_{660}$  为纵坐标作图得无机磷标准曲线。

##### 2. 5'-核苷酸磷的测定

吸取 RNA 酶解液 0.5 毫升,用蒸馏水定容至 50 毫升,摇匀。取出 1 毫升,按下页表进行测定。

甲(氧化)指过碘酸的氧化作用,加样品后再加 30% 乙二醇以破坏过剩的过碘酸;乙(不氧化)指加样前先加 30% 乙二醇,以破坏过碘酸的作用。

对照空白进行比色测定,读取甲、乙管光密度值,根据无

管号	6% 过 碘酸 (毫升)	酶解液 (毫升)	水 (毫升)	作用 一分 钟	30% 乙二 醇 (毫升)	酶解液 (毫升)	2M 甲胺 (毫升)	45 ℃保 温 10分 钟	定磷 试剂 (毫升)	45 ℃发 色 20分 钟	OD <sub>660</sub>
空白	0.1	—	2		0.4	—	0.5		3		
甲 <sub>1</sub> (氧化)	0.1	1	1		0.4	—	0.5		3		
甲 <sub>2</sub> (氧化)	0.1	1	1		0.4	—	0.5		3		
乙 <sub>1</sub> (不氧化)	0.1	—	1		0.4	1	0.5		3		
乙 <sub>2</sub> (不氧化)	0.1	—	1		0.4	1	0.5		3		

机磷标准曲线查出磷含量。甲和乙磷含量之差即 5'-核 苷 酸 磷, 按下式可计算出酶解液中 5'-核苷酸含量。

5'-核苷酸含量 (毫克/毫升)

$$= \frac{\text{甲含磷量(微克/毫升)} - \text{乙含磷量(微克/毫升)} \times 340 \times 100}{31 \times 1000}$$

式中: 31 为磷原子量, 340 为四种单核苷酸平均分子量, 100 为样品稀释倍数。

从酶解前 RNA 总量及酶解后 5'-核苷酸总量, 便可计算出降解率:

$$\text{降解率}(\%) = \frac{\text{5'-核苷酸总量}}{\text{RNA 总量}} \times 100$$

#### IV. 单核苷酸的离子交换柱层析分离

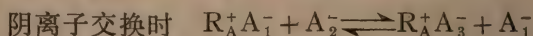
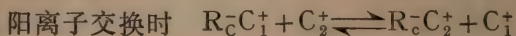
##### 一、目的

用离子交换树脂分离四种 5'-单核苷酸, 学习和掌握离子

交换树脂柱层析的分离技术。

## 二、原理

离子交换层析法是指溶液中的离子通过和交换剂上的解离基团进行连续的、竞争性的交换平衡而达到分离目的的方法。具体地说包括吸附和洗脱二个过程，而且都是根据质量作用定律进行的。



(R 代表离子交换剂骨架； $C^+$ ， $A^-$ ，分别代表阳离子和阴离子。)

要成功地分离某物质，必须根据该物质的解离性质，选择适当类型的离子交换剂，并控制吸附和洗脱条件。

核苷酸由碱基、核糖和磷酸组成，可解离的基团是氨基、烯醇基和磷酸基，解离常数(pK)见下页表，它们是进行离子交换层析分离的基础。烯醇基的 pK 值常在 9.5 左右，此 pK 值一般不用于核苷酸的分离。而氨基和磷酸基却很重要，磷酸基一级解离的 pK 值为 0.7~1.0，相对各核苷酸来说数值比较接近，因此不能用作彼此分离的主要依据；而氨基(尿嘧啶核苷酸 UMP 除外)却不同，它们的 pK 值在 2~5 之间相差较大，在离子交换层析分离中起着决定性的作用。

核苷酸可用阴离子或阳离子交换树脂进行分离。应用阴离子交换时，先在一定 pH 条件下使磷酸基解离带负电荷而被树脂吸附，然后降低 pH 进行洗脱，使磷酸基和氨基的解离度减小，分子的净电荷发生变化，这样就能把它们层析分离开来。

本实验采用阳离子交换法，其原理见图 26，在 pH 1.5 时，核苷酸的磷酸基大部份解离带负电，UMP 因无氨基，净

四种单核苷酸的解离常数(p*k*)

核 苷 酸	氨基(NH <sub>2</sub> )	烯醇基(OH)	磷酸基一级解离	磷酸基二级解离
腺嘌呤核苷酸 (AMP)	3.70	—	0.89	6.01
鸟嘌呤核苷酸 (GMP)	2.30	9.70	0.70	5.92
胞嘧啶核苷酸 (CMP)	4.24	—	0.80	5.97
尿嘧啶核苷酸 (UMP)	—	9.43	1.02	5.88

电荷为负值不与阳离子树脂进行交换而直接流出来，AMP、CMP、GMP 具有氨基，在此 pH 条件下解离带正电，因此分子的净电荷为正值，被阳离子树脂吸附，然后再利用在 pH2~5

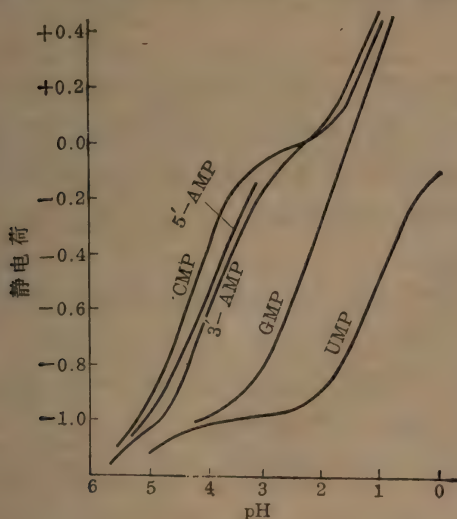


图 26 核苷酸分子的净电荷与 pH 的关系



之间各种核苷酸氨基  $p^k$  值的不同, 净电荷产生明显的差异。因此, 当用蒸馏水(或无离子水)进行洗脱时, 便可将它们一一分开。

根据核苷酸分子的净电荷与pH之间的关系(图26), 在理论上洗脱次序应是  $UMP \rightarrow GMP \rightarrow AMP \rightarrow CMP$ , 而实际的分离情况却是  $UMP \rightarrow GMP \rightarrow CMP \rightarrow AMP$ , 这是由于应用聚苯乙烯树脂为交换剂时, 树脂对嘌呤碱的吸附能力大于对嘧啶碱的吸附能力(非极性吸附), 致使 AMP 和 CMP 的洗脱位置发生互换。

用蒸馏水洗脱, UMP 最先洗出, 以后随着流出液 pH 逐步升高, GMP 和 CMP 分别相继洗下, 经过一段较长的无核苷酸空白区, AMP 最后流出。本实验为缩短整个洗脱过程, 用蒸馏水将 UMP, GMP, CMP 洗下后, 换用 3% NaCl 作洗脱液, 增加竞争性离子强度, 减弱树脂的吸附作用, 使 AMP 提前洗出。

柱层析分离过程中, 最方便是通过紫外吸收光谱的测定进行定性和定量, 也可先根据紫外吸收斑点定性观察分离效果, 再通过 5'-磷酸测定作定量分析, 最后进行纸电泳鉴定。

### 三、实验材料, 仪器和试剂

#### 1. 实验材料

交换剂: 聚苯乙烯-二乙烯苯磺酸型阳离子交换树脂(全交换量 5 毫克当量/1 克干树脂, 粒度 150~300 目, 交联度  $1 \times 8$ ), 上海化工学院产品, 相当于 Zerolite (英国)。

单核苷酸: 酵母 RNA 酶解液。

精密试纸 pH 0.5~5.0; 滤纸; 纱布。

#### 2. 仪器

吸管 0.1 毫升( $\times 1$ ), 0.5 毫升( $\times 5$ ), 1 毫升( $\times 2$ ), 5 毫

升( $\times 2$ ); 试管  $1.5 \times 15$  厘米( $\times 100$ ); 层析柱  $1 \times 20$  厘米( $\times 1$ ); 烧杯 250 毫升( $\times 2$ ); 玻棒; 滴管。

自动部分收集器; 751 型分光光度计或 72 型分光光度计; 紫外层析灯; 电热恒温水浴箱; 电吹风; 铅笔; 尺。

### 3. 试剂(配制方法见本实验Ⅲ)

6% 过碘酸试剂; 30% 乙二醇; 2M 甲胺; 定磷试剂。

## 四、操作步骤

### 1. 离子交换树脂的前处理

新树脂先用水浸泡, 以浮选法去除漂浮物及杂质后, 用  $1 \sim 2N$  NaOH 浸洗, 再用蒸馏水洗涤到近中性; 以  $1 \sim 2N$  HCl 浸洗, 再以蒸馏水洗涤到近中性, 如此反复碱、酸处理  $1 \sim 2$  次, 然后用适当试剂处理, 使成为所要求的型式(如 H 型用 HCl 处理, Na 型用 NaOH 或 NaCl 处理, 本实验为 H 型), 最后水洗至中性, 待用。

### 2. 装柱(装置示意图见图 27)

柱先用铁架、铁夹垂直固定, 在经过前处理的树脂中加入少量蒸馏水, 搅匀, 缓慢地加到柱内, 然后打开下端活塞, 边排水边继续加树脂(注意切勿使水面低于树脂表面), 直至树脂高度达 12 厘米左右。要求柱内无气泡, 均匀, 无明暗界面产生, 树脂表面应水平。装完后, 为使柱稳定, 需用蒸馏水流过平衡过夜。

### 3. 加样及洗脱

加样前, 柱先用  $0.03N$  HCl 流过, 直至流出液 pH 达 1.5。

将树脂表面多余之液体用滴

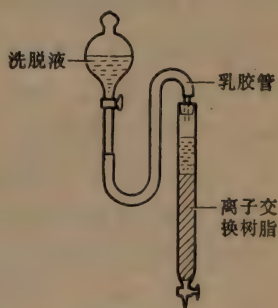


图 27 离子交换柱层析装置示意图

管轻轻地吸去后,用移液管沿柱壁缓缓加入样品(约 20 毫克混合物),注意不使树脂表面扰动,打开下端活塞,样品被吸收后,立即用少量蒸馏水将玻璃柱内表面附着的样品洗下,再在柱表面加蒸馏水至颈端并加塞,然后和柱上端洗脱液瓶接通,用蒸馏水进行洗脱。通过流出液紫外吸收光谱或紫外吸收斑点观察,待前三个峰出现后,即换用 3% NaCl 作洗脱液。

洗脱开始时,打开自动部分收集器,调节到每隔 5 分钟转动一次,流速控制 3 毫升/5 分钟,随着洗脱的连续进行,一般流速会降低,为使恒定,常可通过升高洗脱液面的高度来调整。

#### 4. 流出液紫外吸收斑点观察

核酸的各种碱基在紫外部分都有强烈吸收,因此,当用滤纸作定性观察时,如流出液中含核苷酸,则在紫外层析灯下呈暗黑色的吸收斑点,颜色的深度代表其含量的高低。

用一干净玻棒,按次序将上述各管收集的流出液各蘸一滴于已划格编号的滤纸上(编号应与收集管号相同,并注意在点下一管之前,玻棒需在盛蒸馏水的烧杯中洗涤并用纱布擦干),然后用电吹风将湿点吹干,置紫外层析灯下观察,呈现吸收斑点处用铅笔圈出,用+, ++, +++……表示颜色的深度。

通过流出液紫外吸收斑点的观察,可以了解柱层析分离情况,待被分离的四种 5'-核苷酸全部现出即为洗脱终点(约需 4~5 小时),停止洗脱,关闭自动部分收集器。

#### 5. 流出液 5'-核苷酸的测定

##### (1) 5'-核苷酸磷的测定(原理、方法见本实验 III)

吸取 6% 过碘酸试剂 0.1 毫升于试管中,加入样品 1 毫升(空白用蒸馏水代替),混匀,室温反应约 1 分钟,加 30% 乙二醇 0.4 毫升(破坏过量的过碘酸),再加 2M 甲胺 0.5 毫升,混匀,45°C 水浴反应 10 分钟;加入定磷试剂 3 毫升,混匀,

45°C水浴保温 20 分钟,冷至室温后于 660 毫微米读取光密度 ( $OD_{660}$ )。

为了减少测定工作量,可根据滤纸的紫外吸收斑点观察,按吸收峰的大致分布和形状,适当进行“跳间”抽测。

测定吸收峰范围内的 5'-核苷酸含量时,需将流出液稀释 10 倍(0.5→5.0 毫升),而峰间各管不必稀释,可直接进行测定。

## (2)紫外吸收法测定

由于核苷酸组份中的碱基都具有共轭双键,在紫外区有吸收谱带,260 毫微米处吸收最大。因此,根据 260 毫微米的光密度测定值和已知核苷酸在 260 毫微米的克分子消光系数,可以算出它们的含量(参见实验 35)。

应用紫外吸收法测定吸收峰范围内的 5' 核苷酸含量时,一般需稀释 50 倍(0.1→5 毫升),峰间则不必稀释。

## 6. 5'-核苷酸分离曲线的制作

以横坐标代表管号(或流出液体积),纵坐标代表每毫升流出液的光密度值 ( $OD_{660}$ 或 $OD_{260}$ ,注意应将测定时的稀释倍数计算在内)作图,得到 5'-单核苷酸分离曲线。

用定磷法测定时,则需进一步通过纸电泳来确定样品中核苷酸的种类。

如用紫外吸收法测定,由于各种单核苷酸都有特征的吸收光谱,因此,根据已分离的样品在 250, 260, 280, 290 毫微米的光密度值,计算出相应的比值 ( $OD_{250}/OD_{260}$ ,  $OD_{280}/OD_{260}$ ,  $OD_{290}/OD_{260}$ ),并与已知单核苷酸的标准比值(见实验 35)比较,便可对核苷酸的性质作出判断。



## V. 单核苷酸的纸电泳法鉴定

### 一、目的

用纸电泳法鉴定柱层析分离的 5'-核苷酸, 掌握纸电泳技术。

### 二、原理

纸电泳法是以纸作为惰性支持物, 利用物质电学性质上的差异在电场中产生泳动而进行的分离、鉴定方法。

AMP, GMP, CMP, UMP

四种单核苷酸可以用电泳法分离、鉴定的主要依据是在 pH 3.5 时, 核苷酸磷酸基的一级解离是完全的, 磷酸基的二级解离全部不能进行, 因而使每一核苷酸分子带有一负电荷, 但氨基的解离程度则因解离常数不同而不同(图 28), 净负电荷在 pH 3.5 时差异最大(见下页表)。这样, 在进行电泳时, 单核苷酸向正极移动, 由于净电荷的大小, 其次序  $UMP > GMP > AMP > CMP$ , 可将它们一一分开。

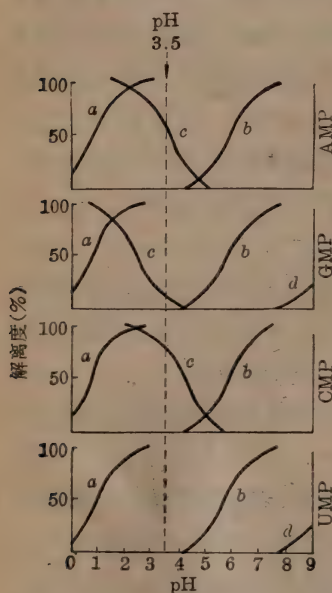


图 28 单核苷酸的解离曲线

- a. 磷酸基一级解离;
- b. 磷酸基二级解离;
- c. 碱基氨基解离;
- d. 碱基烯醇基解离

电泳后的滤纸, 凡有核苷酸样品的地方, 在紫外层析灯下就显示暗黑色斑点(或区带), 将此斑点(或区带)剪下,

四种单核苷酸在 pH3.5 时的解离度

核苷酸	氨基解离常数	解离度	净电荷
AMP	3.70	0.54	0.46
GMP	2.30	0.05	0.95
CMP	4.24	0.84	0.16
UMP	—	—	1.00

在一定条件下经洗脱后，用紫外分光光度计测其特征吸收光谱可确定某种成分。根据每一单核苷酸在一特定波长下具有一定的克分子消光系数便可计算其浓度，进行定量测定(见实验 35)。

本实验要求通过纸电泳法定性鉴定柱层析分离后四个峰的成分。为此，以四种标准单核苷酸同时作比较鉴别用。

### 三、实验材料、仪器和试剂

#### 1. 实验材料

根据测定，分别选用四个吸收高峰相应管号的流出液为代表。

标准单核苷酸 (2毫克/毫升)：分别称取 AMP, GMP, CMP, UMP 四种单核苷酸 10 毫克，各溶于 5 毫升蒸馏水中。

酶解液；新华 1 号滤纸 15×30 厘米。

#### 2. 仪器

电泳仪；紫外层析灯；电吹风；喷雾器；毛细管；铅笔；尺。

#### 3. 试剂

pH3.5 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液：称取柠檬酸 ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ) 16.20 克，柠檬酸钠 ( $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ ) 6.70 克，溶解后定容至 2000 毫升。

#### 四、操作步骤

##### 1. 缓冲液的装放

将 pH3.5 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液注入电泳槽内, 共约 2000 毫升, 注意二边槽内液面高度应一致。

##### 2. 点样(采用干点法)

距离纸端 7 厘米处先划一基线, 从基线的中点开始向左右二侧各间隔 1.3 厘米作一记号, 然后用毛细管分别将酶解液、柱层析分离之流出液(四个吸收高峰)以及四种标准核苷酸(共九点)小心点于滤纸上, 点直径为 2 毫米左右, 点完一次后, 用吹风吹干, 再点一次样品, 再吹干。由于核苷酸含量不同, 为在紫外层析灯下清晰地观察电泳后的分离图谱, 除流出液的第 3、4 二峰点 8 次外, 其余样品均点 4 次。待样品全部点完后, 用盛有相同缓冲液的喷雾器将滤纸喷湿, 有样品处最后喷, 注意液量, 控制喷射均匀。

##### 3. 电泳

将滤纸平整地放在电泳槽内的滤纸架上, 纸二端垂于缓冲液中, 接上电极, 注意点样端为负极(切勿错接), 调节电压 380 伏左右, 室温电泳 2.5 小时。

##### 4. 烘干

电泳完毕后, 关闭电源, 拔下电极插头, 取出滤纸平放于玻璃架上, 80~100°C 烘箱中烘干。

##### 5. 紫外吸收观察及成分的确定

取出烘干的滤纸, 在紫外层析灯下观察分离情况, 用铅笔圈出各吸收点的位置, 并与同一图谱上的标准单核苷酸作比较, 确定各峰的成分。

## 40. 脱氧核糖核酸的碱基组成及其含量测定

### 一、目的

学习脱氧核糖核酸 (DNA) 中碱基的定性及含量分析方法。

### 二、原理

测定核酸的嘌呤碱和嘧啶碱的组成首先要使核酸进行彻底水解,使水解最终产物为碱基。一般水解的方法很多,其中高氯酸水解是较好的方法。高氯酸的水解产物为游离的碱基,但是胸腺嘧啶会遭破坏,使回收率降低。利用纸上层析法可以把碱基清楚地分离开,其方法与氨基酸层析相仿,主要不同在于氨基酸层析一般采用上行法,而核酸的碱基层析一般采用下行法。因为溶剂要走较长的距离才能将这几个成分分开,在下行法中,溶剂虽然已行至滤纸的下缘进而流出纸端,但只要层析溶剂槽内有足够的溶剂,层析尚可继续进行,因而便无须很长的滤纸。由于嘌呤碱和嘧啶碱对紫外光有强烈吸收,因此也可以在紫外层析灯下鉴定结果。如将斑点剪下,经洗脱后可在紫外分光光度计上作定量测定,求出此核酸中各嘌呤碱和嘧啶碱的含量。

### 三、实验材料,仪器和试剂

#### 1. 实验材料

标准碱基溶液:鸟嘌呤 (Gua),腺嘌呤 (Ade),胞嘧啶 (Cyt),胸腺嘧啶 (Thy) 分别以  $0.1N$  盐酸配成 5 毫克/毫升溶液。其中鸟嘌呤需用  $1N$  盐酸配制,若是鸟嘌呤盐酸盐则仍可用  $0.1N$  盐酸溶解。

小牛胸腺或鱼精 DNA (上海牛奶公司综合加工厂)。

新华滤纸  $15 \times 45$  厘米;广范 pH 试纸。



## 2. 仪器

吸管 5 毫升( $\times 1$ ), 0.2 毫升( $\times 1$ ); 微量进样器 10 微升( $\times 4$ ), 50 微升( $\times 1$ ); 小试管 1.0 $\times$ 7.5 厘米( $\times 1$ ); 试管 1.5 $\times$ 15 厘米( $\times 8$ ); 层析缸 25 $\times$ 60 厘米; 滴管; 毛细管。

751 型分光光度计; 紫外层析灯; 离心机; 水浴锅; 电吹风; 剪刀; 尺; 铅笔。

## 3. 试剂

70% 高氯酸( $\text{HClO}_4$ , 分析纯); 6*N* 氢氧化钾; 0.015 *N* 盐酸。

层析溶剂系统: 异丙醇(分析纯)170 毫升, 浓盐酸(分析纯)41 毫升, 加水至 250 毫升。

## 四、操作步骤

### 1. DNA 的水解

称取 5 毫克 DNA 置于小试管内, 加入 100 微升 70% 高氯酸, 然后将试管封成安瓿管。100 $^{\circ}\text{C}$  沸水浴中加热 1 小时, 打开安瓿管, 用 6*N* 氢氧化钾调 pH 到 4 左右。

### 2. 点样, 层析

距滤纸一端 10 厘米处用铅笔划一基线, 从中间向二侧相距 2 厘米作一记号, 共五点。滤纸的另一端用剪刀剪成锯齿状, 以利于溶剂及时滴出纸外, 使下行层析能连续进行。用毛细管将各种标准碱基溶液和 DNA 水解液按图点在层析滤纸的记号上, 用电风吹干后再点第二次, 注意务必使几次点样的斑点重合, 各

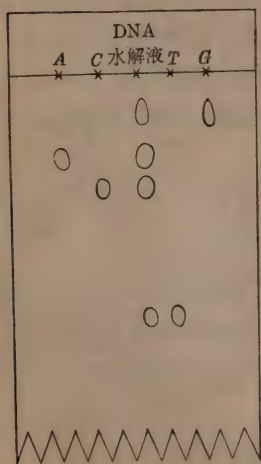


图 29 碱基层析示意图

种标准碱基溶液点样 5 微升, DNA 水解液点样 30 微升。待样品斑点完全干燥后小心地把滤纸悬于层析缸中(此时切勿使滤纸与溶剂相接触)。平衡一小时后,小心地把滤纸放入盛放层析溶剂的玻璃船内,并用一粗玻棒压住滤纸以免滤纸从玻璃船中滑下。下行层析 20 小时后取出滤纸,晾干或用电吹风吹干。

### 3. 层析结果观察

已干燥的滤纸在紫外层析灯下观察结果,用铅笔画出各紫外吸收斑点,根据标准碱基层析的位置确定 DNA 水解液中相应各斑点为何种碱基。

### 4. DNA 中各种碱基的含量测定

剪下 DNA 水解液经层析后分离的各碱基斑点,同时在其附近剪下同样大小的空白滤纸作为对照。滤纸片分别置于 8 支试管内,加 3 毫升 0.015*N* 盐酸,浸泡 6~8 小时(不时加以摇动)。洗脱液经 3000 转/分离心 5 分钟除去滤纸纤维,用克分子消光系数法测出各上清液中碱基的含量。每一种碱基洗脱液分别以相应的空白滤纸洗脱液作对照,在此碱基的最大吸收波长下(pH2 时)测光密度(OD)值,即可计算得 DNA 水解液层析谱中各碱基的量(具体测定计算方法见实验 35 中有关部分)。

碱基	分子量	$\lambda_{\text{最大}}(\text{pH}2)$	$\epsilon_{\text{最大}} \times 10^{-3}$	测定溶液总体积 (毫升)	OD <sub><math>\lambda</math></sub>	碱基量 (毫克)
腺嘌呤	135.1	262.5nm	13.15	3		
鸟嘌呤	151.1	275.5nm	7.35	3		
胞嘧啶	111.1	276.0nm	10.0	3		
胸腺嘧啶	126.1	264.5nm	7.89	3		

# 41. DEAE-纤维素薄层层析——核苷及核苷酸的分离; AMP、ADP 及 ATP 的分离

## 一、目的

学习核苷与核苷酸的分离方法以及 AMP、ADP、ATP 相互分离的方法。

## 二、原理

应用纤维素粉或其它诸如硅酸、氧化铝等吸附剂来分离核苷和核苷酸混合物或分离 AMP、ADP、ATP, 往往效果不佳, 而应用离子交换纤维素进行层析分离效果显著提高。

本实验中所采用的 DEAE-纤维素具下列结构:



DEAE-纤维素的结构使它除了具有分配层析的作用外, 还具有阴离子交换的能力, 因此它对于分子量大小相似, 而在

一定 pH 值时带的电荷数略有差异的物质, 有较大的分离能力。

在 pH2.0 或 pH2.3 时, 各核苷酸的磷酸基一级解离程度一致, 而各核苷酸的氨基由于其 pK 值不同导致解离程度各不相同, 因此它们带负电荷的量是:  $UMP > GMP > AMP > CMP$ 。带负电荷愈多, 与 DEAE-纤维素进行离子交换的能力愈大, 因而样品移动的速度就愈慢。在 DEAE-纤维素薄层上各核苷酸上行的速度是  $CMP > AMP > GMP > UMP$ 。核苷没有磷酸基, 不具有负电荷, 展层后位于核苷酸前面, 因此能与相应的核苷酸分离开。

腺嘌呤一磷酸核苷酸 (AMP), 腺嘌呤二磷酸核苷酸 (ADP) 和腺嘌呤三磷酸核苷酸 (ATP) 三者带有不同量的磷酸基。在 pH3.5 时, 它们带的负电荷量是:  $ATP > ADP > AMP$ 。所以在 DEAT-纤维素薄层层析中亦能分离。

此方法最小检出量为 1~2 微克, 它可以与紫外分光光度计配合使用进行定量测定。

### 三、实验材料, 仪器和试剂

#### 1. 实验材料

核苷溶液: 腺苷 (AR)、鸟苷 (GR)、尿苷 (UR)、胞苷 (CR) 分别以 0.01N 盐酸配成 10 毫克/毫升的溶液。

核苷酸溶液: AMP、GMP 分别以 0.1N 盐酸配制成 10 毫克/毫升溶液; UMP、CMP 分别以 0.01N 盐酸配成 10 毫克/毫升溶液。

核苷-核苷酸混合溶液: AR-AMP, GR-GMP, UR-UMP, CR-CMP 分别以 0.1N 盐酸或 0.01N 盐酸配成 10 毫克/毫升溶液。

腺苷酸溶液: AMP、ADP、ATP 及三种样品混合物各以



0.1N 盐酸配成 10 毫克/毫升溶液。

DEAE-纤维素 (层析用, 国产或 “Serva” DEAE-纤维素)。

## 2. 仪器

玻璃板 10×20 厘米(×1), 20×20 厘米(×1); 烧杯 250 毫升(×1); 层析缸 25×30 厘米; 毛细管 0.5 毫米直径。

紫外层析灯; 铅笔; 尺。

## 3. 试剂

1N 氢氧化钠(分析纯); 1N 盐酸(分析纯)。

层析溶剂系统:

分离核苷-核苷酸——0.01N 盐酸 (pH2.0) 或 0.005N 盐酸(pH2.3)。

分离 AMP-ADP-ATP——0.1M 柠檬酸缓冲液 (pH 3.5)或 0.02N 盐酸(pH1.7)。

## 四、操作步骤

### 1. 制板

国产 DEAE-纤维素或 “Serva” DEAE-纤维素以 1N 氢氧化钠浸泡一小时, 用蒸馏水洗至中性。再用 1N 盐酸浸泡一小时, 蒸馏水洗至中性, 即得糊状 DEAE-纤维素( $\text{Cl}^-$ 型), 冰箱保存备用。

已处理过的 DEAE-纤维素( $\text{Cl}^-$ 型)加水调匀(干粉:水 = 1:12W/W), 铺在已调整水平的洁净玻璃板上, 加水调匀后的糊状 DEAE-纤维素 100 克可铺 20×20 厘米和 10×20 厘米玻璃板各一块。铺好的板在室温下放置, 待薄层表面固定后于 60℃ 烘箱烘干 (烘箱垫板亦要校正到水平)。烘干的薄板放置在干燥器中备用。

### 2. 核苷-核苷酸的分离

点样前将备用板(20×20厘米)在60℃烘箱中烘15~30分钟。在离板一端15毫米处用铅笔轻轻作十二点记号,用毛细管点样,点样体积1~2微升(含样品10~20微克)。待样品干后,将板放入层析缸内,室温下展层2~3分钟。溶剂前沿从点样线起上行7~7.5厘米即可取出薄板,60~80℃烘箱中烘干。在紫外层析灯下观察结果,用铅笔画出紫外吸收斑点的位置。

用0.01*N*盐酸(pH2.0)或0.005*N*盐酸(pH2.3)二种溶剂系统都能很好地分离各对核苷-核苷酸。脱氧核苷-脱氧核苷酸也能得到类似的结果。

### 3. AMP-ADP-ATP 混合物的分离

备用板(10×20厘米)在60℃烘箱中烘15~30分钟。在离板一端15毫米处每隔2厘米作一记号,共四点。每种样品点样体积1~2微升(含样品10~20微克)。室温下展层10分钟,溶剂前沿从点样线起上行10厘米即可取出薄板,60~80℃烘箱中烘干,置紫外层析灯下观察并记录结果。

## 42. 核糖核酸碱水解产物的

### 琼脂糖电泳鉴定

#### 一、目的

用琼脂糖凝胶电泳鉴定核糖核酸(RNA)碱水解所得的核苷酸成分,掌握琼脂糖电泳分离单核苷酸的方法。

#### 二、原理

核糖核酸经酶解或碱水解后可得到四种单核苷酸,即腺嘌呤核苷酸(AMP),鸟嘌呤核苷酸(GMP),胞嘧啶核苷酸(CMP)和尿嘧啶核苷酸(UMP),在pH3.2的条件下,上述四种单核苷酸带有数量不同的负电荷(原理见实验39中纸电泳

鉴定部分), 因此它们在电场中向正极移动的速度是:  $UMP > GMP > AMP > CMP$ , 从而达到分离。

琼脂糖电泳是以琼脂糖凝胶作为惰性支持物, 使被分离物质在它上面进行电泳分离。琼脂糖是由琼脂除去琼脂胶后纯化而得。由于除去了不少带负电荷的极性物质 (主要是磷酸基和一定量的羧基), 因此克服了用琼脂作电泳支持物时的电渗和吸附作用。鉴于琼脂糖凝胶电泳具有分辨率高、分离速度快、操作方便以及支持介质透明而无紫外吸收等特点, 近年来已成为核酸及核苷酸类物质分离、鉴定的常用技术。核苷酸类物质的分离一般在十分钟内即能完成, 并可直接利用紫外光作定性鉴定及定量测定。

本实验要求通过琼脂糖电泳鉴定 RNA 经碱溶液水解成四种单核苷酸的成分。为此用四种标准单核苷酸同时作比较鉴别用。

### 三、实验材料, 仪器和试剂

#### 1. 实验材料

四种标准单核苷酸 AMP、GMP、CMP 和 UMP 分别以 0.1 N 盐酸配成 2 毫克/毫升的溶液。

核糖核酸(上海药用辅料厂); 琼脂糖(生化试剂, 上海东海制药厂); 厚质滤纸(Whatman No.3); 滤纸; 广范试纸 pH 1~12。

#### 2. 仪器

吸管 1 毫升( $\times 1$ ), 10 毫升( $\times 1$ ); 微量进样器 10 微升( $\times 5$ ); 试管  $1.0 \times 7.5$  厘米( $\times 1$ ); 量筒 50 毫升( $\times 1$ ); 烧杯 100 毫升( $\times 1$ ); 玻璃板  $7 \times 7.5$  厘米( $\times 1$ ); 滴管。

电泳仪与电泳槽; 紫外层析灯; 药物台秤; 电吹风; 恒温水浴箱或温箱; 温度计; 水浴锅; 镊子; 刀片; 特种铅笔; 尺。

### 3. 试剂

0.05M 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, pH3.2: 0.05M 柠檬酸溶液 830 毫升与 0.05M 柠檬酸三钠溶液 140 毫升混合, 以 pH 计校正混合液 pH 到 3.2。

0.3N KOH; 高氯酸(分析纯)。

### 四、操作步骤

#### 1. RNA 的碱水解

经常用来水解 RNA 的碱有 NaOH、KOH 等, 但以 KOH 为好, 因为水解后用高氯酸中和水解液, 生成的高氯酸钾溶解度小而沉淀, 这样可除去水解液中的钾离子。

称取 5 毫克 RNA 置于小试管中, 加入 1 毫升 0.3N KOH, 然后将此试管封成安瓿管。38°C 恒温水浴箱内(或温箱中)保温 18 小时, 使完全水解成单核苷酸。打开安瓿管, 用高氯酸中和至 pH5~6 左右, 待测。

#### 2. 琼脂糖凝胶板的制备

称取 0.2 克琼脂糖, 加 25 毫升蒸馏水, 水浴加热溶解。另取 25 毫升 pH3.2、0.05M 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液加热至近沸, 趁热与前者混匀, 即得 0.4% pH3.2、0.025M 柠檬酸缓冲液的琼脂糖溶液, 备用。

已洗净的 7×7.5 厘米玻璃板平放于预先用水平仪校正的平板上。水浴加热使 0.4% 琼脂糖熔化, 稍冷到 60°C 左右, 吸取 7~8 毫升此琼脂糖溶液铺于玻璃板上, 静止 10~20 分钟使其凝固。

#### 3. 加样

用刀片把厚质滤纸裁成宽 1.5 毫米、长 8 毫米的小条。用微量进样器吸取每种单核苷酸溶液 5 微升以及 RNA 水解液 10 微升, 分别加到五片小滤纸条上, 吹干。用一片刀口宽 8



毫米的薄刀片在离凝胶板一端 1 厘米的基线中间插入凝胶，用镊子将吸有 RNA 水解液的小纸条嵌入刀片切开的狭缝中，取出刀片。在此小纸条二侧分别以 0.5 厘米的间隔嵌入另四条吸有不同单核苷酸样品的小纸条。注意在嵌入时不能使纸条歪斜。

#### 4. 电泳

向二侧电极槽中倒入 pH 3.2、0.05M 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，使二槽中的液面在同一水平面上。已加好样品的琼脂糖凝胶板平放于电泳槽中，样品端为负极。此凝胶板与电极槽缓冲液的液面越近越好，用以缓冲液浸湿的滤纸覆盖于琼脂糖凝胶板的二端作盐桥。

接通电源，调节电压到 300 伏，电泳持续 10 分钟后关闭电源，取出凝胶板。

#### 5. 结果观察

琼脂糖凝胶板在紫外层析灯下观察，在玻板背面画下紫外吸收斑点，比较 RNA 水解液与标准单核苷酸样品电泳的结果，鉴定 RNA 的核苷酸组分。

### 43. ECORI 酶解 $\lambda$ 噬菌体 DNA

#### 片段的电泳分离<sup>[28, 29]</sup>

##### 一、目的

掌握琼脂糖凝胶电泳分离 DNA 片断的方法。

##### 二、原理

限制性内切核酸酶 ECORI 对  $\lambda$  噬菌体 DNA 有五个切点，因此酶解后生成六个 DNA 片段。当以琼脂糖作为电泳支持介质时，被分离 DNA 的电泳迁移率仅与 DNA 的分子量有关，因而当 DNA 片段分子量不同时可获得分离。

利用溴乙锭插入 DNA 后在紫外线照射下发出桔红色荧光可检出 DNA 各片段的区带。

### 三、实验材料, 仪器和试剂

#### 1. 实验材料

$\lambda$ DNA (进口)以蒸馏水配成 500 微克/毫升的溶液。

ECORI(进口)以蒸馏水配成 2.5 毫克/毫升的溶液。

琼脂糖(生化试剂, 上海东海制药厂)。

#### 2. 仪器

试管  $1 \times 7.5$  厘米( $\times 1$ ); 玻璃管  $0.6 \times 15$  厘米( $\times 4$ ); 微量进样器 10 微升( $\times 7$ ), 50 微升( $\times 1$ ); 烧杯 50 毫升( $\times 1$ ); 量筒 50 毫升( $\times 1$ ); 滴管; 玻棒。

电热恒温水浴箱; 水浴锅; 电泳仪; 盘状电泳槽; 紫外层析灯; 温度计; 台秤; 刀片; 橡皮圈; 尼龙布; 橡皮塞。

#### 3. 试剂

TMN 缓冲液: 0.1M Tris-盐酸缓冲液, pH 7.6, 内含 5mM 氯化镁, 50mM 氯化钠。

10 $\times$  TMN 缓冲液: 比上述 TMN 缓冲液浓十倍。

0.1% 明胶: 0.1 克明胶溶于 100 毫升水中。

溴酚蓝-蔗糖溶液: 0.2 克溴酚蓝, 50 克蔗糖溶于 100 毫升蒸馏水。

电泳缓冲液——89mM 三羟甲基氨基甲烷(Tris), 89mM 硼酸, 2.5mM 乙二胺四乙酸二钠( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ), pH 8.5, 含溴乙锭(EB)0.5 微克/毫升: 称取 10.8 克 Tris, 5.5 克硼酸和 0.93 克  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 以蒸馏水定容到 1000 毫升, 加 0.5 毫克溴乙锭。

### 四、操作步骤

#### 1. ECORI 酶切 $\lambda$ DNA

10 微升 0.5 微克/微升  $\lambda$ DNA 溶液 中加 3 微升 2.5 微克/微升的 ECORI 溶液、5 微升  $10\times$  TMN 缓冲液、5 微升 0.1% 明胶溶液, 然后以 27 微升蒸馏水补体积到 50 微升。此混合液于  $37^{\circ}\text{C}$  中保温 1 小时, 取出,  $65^{\circ}\text{C}$  加热五分钟使酶失活。再加 10 微升溴酚蓝-蔗糖溶液于内, 混匀备用。

## 2. 琼脂糖凝胶的制备

称取 0.2 克琼脂糖于小烧杯内, 加入 20 毫升电泳缓冲液, 水浴内加热搅拌至完全溶解, 以蒸馏水校正总体积到 20 毫升。取洗净的  $0.6\times 15$  厘米玻璃管 4 支, 一端以橡皮塞封住, 用滴管把  $60\sim 80^{\circ}\text{C}$  的琼脂糖溶液注满玻管。待琼脂糖凝固后, 尼龙布包在每支凝胶管的顶部并用橡皮圈扣紧, 然后颠倒此凝胶管, 除去橡皮塞, 让凝胶从玻管口稍滑出一些, 用刀片切去前部不平的凝胶而成一平坦的表面。让凝胶向下滑入玻管内并贴在尼龙布上。

## 3. 凝胶管的安装及上样

将琼脂糖凝胶管垂直插入上电极槽底板的橡胶塞孔中, 使凝胶管在孔上部分刚可见到凝胶层的顶部, 注意橡胶塞孔必须密封不漏。

上、下两电极槽中装放电泳缓冲液, 凝胶管两端必须浸没在缓冲液内。用微量进样器吸取已加溴酚蓝-蔗糖溶液的  $\lambda$ DNA 酶解液 10 微升, 小心地加在缓冲液下的凝胶顶部; 另用一支微量进样器吸取 3 微升  $\lambda$ DNA [预先在 DNA 溶液中加入溴酚蓝-蔗糖溶液(体积比为 5:1)] 加样于另一支凝胶顶部作为对照。上述二种样品各做二支凝胶。

## 4. 电泳

接通电源, 上槽为负极, 下槽为正极, 调节电压到 60 伏, 室温电泳 5 小时后关闭电源, 取出玻管。

## 5. 结果观察

小心让凝胶从玻管内滑出,置于层析灯下观察电泳结果,记录有桔红色萤光区带的位置。



## 六、酶

### 44. 酶在生物组织中的分布和 某些因素对酶的影响

#### 一、目的

通过酶的提取和活力测定，了解酶在生物组织中的分布情况和某些因素对酶活力的抑制作用。

#### 二、原理

酶的提取根据蛋白质的溶解原则，一般采用水、稀乙醇、稀丙酮等和组织一起研磨，过滤去渣，其清液即为可溶性的酶液。活力测定所依据原理列于下表：

酶	来源	活力测定所依据的原理
酪氨酸酶	马铃薯	酪氨酸酶可使酪氨酸氧化为醌类化合物，最后形成结构还不清楚的一种黑色物质
过氧化氢酶	肝	过氧化氢酶可使 $\text{H}_2\text{O}_2$ 分解形成 $\text{H}_2$ 及 $\text{O}_2$ ，用吹熄而留有余烬的火柴杆置于试管口上，可见其复燃，证明有 $\text{O}_2$ 产生
脲酶	南瓜子	脲酶可使脲素分解为 $\text{NH}_3$ 及 $\text{CO}_2$ 。 $\text{NH}_3$ 可用蓝色石蕊试纸测其碱性反应，或用钠氏试剂观察其红棕色反应
脂肪酶	南瓜子	脂肪酶分解脂类物质，生成醇和酸，用 pH 试纸测其反应前后 pH 变化
淀粉酶	唾液	利用碘与淀粉呈蓝色反应，淀粉被酶分解，就不再与碘呈蓝色反应

### 三、实验材料, 仪器和试剂

#### 1. 实验材料

马铃薯; 猪肝; 南瓜子; 唾液; 透析袋; 蓝色石蕊试纸; 精密试纸 pH6.4~8.0。

#### 2. 仪器

吸管 1 毫升( $\times 5$ ), 2 毫升( $\times 3$ ), 5 毫升( $\times 2$ ); 滴管( $\times 6$ ); 量筒 10 毫升( $\times 1$ ), 25 毫升( $\times 1$ ); 漏斗 6 厘米( $\times 1$ ); 试管 1.5 $\times$ 15 厘米( $\times 20$ ); 研钵; 水浴锅。

#### 3. 试剂

硝酸银固体; 2% 过氧化氢; 0.05M 叠氮钠; 0.1% 脲素溶液; 0.01% 氯化汞溶液; 丁酸丁酯; 0.1% 淀粉溶液; pH8.5 磷酸缓冲液; 1% 氯化钠。

0.05% 酪氨酸: 用 0.01N 碳酸钠配制。

稀碘液: 碘化钾 15 克, 碘 12.7 克溶解在 200 毫升水。

纳氏试剂: 碘化钾 15 克, 碘 10 克, 汞 15 克和蒸馏水 10 毫升放在 100 毫升平底烧瓶中振荡 15 分钟左右, 使碘完全溶解, 此时溶液温度过高, 可用冷水冷却, 继续振荡使溶液呈浅绿色的碘化钾和碘化汞复盐, 倾出上清液, 定容至 200 毫升, 此为纳氏浓溶液。在应用时取浓溶液 75 毫升加入到 10% 氢氧化钠溶液 350 毫升中, 再加水至 500 毫升。

### 四、操作步骤

#### 1. 酪氨酸酶

取生马铃薯 5 克, 用刀去皮后切成小块, 置研钵中加蒸馏水 10 毫升, 研磨后用纱布过滤, 滤液即酶提取液。按表配置 1~3 号管, 放入 37℃ 水浴培养 1 小时, 观察结果并加以说明。

管号	水 (毫升)	0.05%酪氨酸 (毫升)	酶液 (毫升)	37 °C 培养 1 小时	现象记录	结果解释
1		2	2			
2		2	2(煮沸酶)			
3	1	2	—			

## 2. 过氧化氢酶

取猪肝 3 克加蒸馏水 10 毫升, 置研钵中研磨后用纱布或棉花过滤, 滤液即含有过氧化氢酶。按表配置 4~7 号管, 放入 37°C 水浴培养, 并随时用吹熄而留有余烬的火柴棒检查管口有否氧气逸出。

管号	2%过氧化氢 (毫升)	0.05M 叠氮钠	酶液 (毫升)	37°C 逸 培 养 并 检 查 有 否 氧	现象记录	结果解释
4	3	—	1			
5	3	—	1(煮沸酶)			
6	3	1滴	1			
7	3	—	—			

## 3. 脲酶

称取去壳南瓜子 15 克, 置研钵中磨碎, 加入 84 毫升水与 16 毫升 95% 乙醇混合液, 研磨 15 分钟, 置冰箱中过夜, 倾出上层含脲酶之清液备用。按表配置 8~11 号管, 放在 40~50°C 水浴中, 培养 5 分钟后加纳氏试剂三滴, 观察结果。

## 4. 脂酶

称取去壳南瓜子 5 克置研钵中磨碎, 加 25 毫升水研磨, 过滤后取滤液备用。按表配置 12~14 号管, 放入 37°C 水浴培养 30~60 分钟, 用精密 pH 试纸 (6.4~8.0) 检验 pH 的变化。

管号	水	0.1%脲素	酶液	0.01%氯化汞	40 ~ 50 °C 水浴培养	纳氏试剂	现象记录 和解释
8	3滴	10滴	3滴	—		3滴	
9	3滴	10滴	3滴 (煮沸酶)	—		3滴	
10	—	10滴	3滴	3滴		3滴	
11	6滴	10滴	—	—		3滴	

管号	pH8.5磷酸缓冲液 (毫升)	丁酸丁酯 (毫升)	酶液 (毫升)	37 °C 保温 30 ~ 60 分钟	pH 变化	结果解释
12	0.5	0.5	1.5			
13	0.5	0.5	1.5 (煮沸酶)			
14	2.0	0.5	—			

管号	0.1%淀粉 (毫升)	1%氯化钠 (毫升)	水 (毫升)	唾液 A (毫升)	唾液 B (毫升)	37 °C 保温 10 分钟	碘液	现象记录 和解释
15	3	1	—	—	1		2滴	
16	3	—	1	—	1		2滴	
17	3	—	—	1 (煮沸的)	1		2滴	
18	3	—	1	1 (煮沸的)	—		2滴	
19	3	—	1	1	—		2滴	

## 5. 淀粉酶

(1) 新鲜唾液 (A) 配置: 嗽口后开始收集唾液 1 毫升, 加蒸馏水稀释到 40 毫升, 充分混匀后备用。



(2) 制备不含  $\text{Cl}^-$  离子的唾液 (B): 取上述唾液 (A) 20 毫升放入透析袋中, 置盛有蒸馏水的容器中透析过夜, 直至用硝酸银试验无氯化银混浊反应止, 倾出袋中酶液备用。

按表配置 15~19 管, 放  $37^\circ\text{C}$  水浴中保温 10 分钟后加碘液 2 滴, 观察结果。

## 45. 1398 中性蛋白酶活力测定

### 一、目的

学习蛋白酶活力的测定方法。

### 二、原理

酶活力大小, 通常是以在该酶适宜的温度和 pH 条件下, 酶催化一定时间后, 反应物中底物减少的量或产物形成的量来表示。本实验是以测定产物形成的量来表示 1398 蛋白酶的活力。

蛋白酶能催化蛋白质的肽键水解, 生成游离氨基酸或小肽。如果蛋白酶的活力大则水解的肽键就多, 生成的氨基酸也愈多。本实验采用福林-酚试剂与蛋白质水解出来的酪氨酸(或色氨酸)作用生成蓝色物, 从蓝色深浅的程度可以求知酪氨酸的多少, 从而确定酶活力的大小。

蛋白酶的活力用分解出酪氨酸的量来表示, 目前国内通用的蛋白酶活力单位定为: 每分钟内分解出 1 微克酪氨酸的酶量称为 1 单位。在测定酶活力前, 先用福林酚试剂与已知的不同浓度的酪氨酸作用, 作出蓝色深浅程度(用光密度值表示)与酪氨酸浓度关系的标准曲线。然后再将酶和底物反应的产物与福林酚试剂作用, 在分光光度计上测出光密度, 从标准曲线上查出相当于多少微克的酪氨酸, 再计算出酶的活力单位。

### 三、实验材料, 仪器和试剂

#### 1. 实验材料

1398 蛋白酶粗酶粉(上海新型发酵厂); 滤纸。

#### 2. 仪器

大试管  $3.0 \times 20$  厘米( $\times 6$ ); 试管  $1.5 \times 15$  厘米( $\times 18$ ); 吸管 1 毫升( $\times 14$ ), 2 毫升( $\times 1$ ), 5 毫升( $\times 2$ ), 10 毫升( $\times 1$ )。

721 型分光光度计; 电热恒温水浴箱。

#### 3. 试剂

福林-酚试剂(配法见实验 21 试剂乙)。

标准酪氨酸溶液: 称取 100 毫克酪氨酸(预先在  $105^{\circ}\text{C}$  烘箱干燥至恒重), 加  $0.2N$  盐酸溶解后定容至 100 毫升, 再用水稀释 5 倍, 得到 200 微克/毫升的酪氨酸溶液。

酪蛋白溶液: 称取酪蛋白 2 克, 置 150 毫升三角瓶中, 加入  $0.2M$  磷酸氢二钠 61 毫升, 在水浴上搅拌使溶解, 再加入 39 毫升  $0.2M$  磷酸二氢钠, 得到 pH 7 的酪蛋白液, 倾出上清液备用。

$0.4M$  三氯醋酸溶液(TCA);  $0.4M$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 。

### 四、操作步骤

#### 1. 酪氨酸标准曲线制作

取 6 支大试管, 按下表加入酪氨酸和蒸馏水, 得到一系列不同浓度的酪氨酸溶液。

上述配制的不同浓度酪氨酸溶液各吸取 1 毫升于 6 支试管内。按下表次序加入试剂, 并混合均匀, 然后在  $40^{\circ}\text{C}$  水浴中保温 20 分钟, 取出各管在 721 型分光光度计上, 测出 650 毫微米处光密度值。

以酪氨酸浓度为横坐标, 光密度值为纵坐标, 作出标准

管号	酪氨酸200微克/毫升 (毫升)	水 (毫升)	酪氨酸最终浓度 (微克/毫升)
1	0	10	0
2	1	9	20
3	2	8	40
4	3	7	60
5	4	6	80
6	5	5	100

管号	酪氨酸量 (微克)	0.4M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (毫升)	福林酚试剂 (毫升)	迅速混合后于 40℃放置 20分钟	OD <sub>650</sub>
1	0	5	0.5		
2	20	5	0.5		
3	40	5	0.5		
4	60	5	0.5		
5	80	5	0.5		
6	100	5	0.5		

曲线。

## 2. 蛋白酶活力测定

(1) 浸出酶液：称取 0.5 克酶粉加入 40 毫升水，在室温下放置一小时并时加搅动。将酶浸出液过滤，取滤液 1 毫升用水稀释至 20 毫升，即为稀释 1600 倍酶液。

(2) 活力测定：取 4 支试管，每管中加入稀释好的酶液 1 毫升，第一管作空白，在比色时用此管调节光密度为零，使其他三管在此比色计上读得的光密度值，直接代表酶活力。空

白管在加入酶液后立即加入  $0.4M$  TCA 2 毫升, 使酶在没有遇到底物时已失活。在另外三支试管中加入酶液后, 再加入 1 毫升 pH7 酪蛋白溶液作为底物, 并立即放入  $40^{\circ}C$  水浴准确保温 10 分钟。酶反应时间一达到, 立即在第 2、3、4 管中加入  $0.4M$  TCA 2 毫升, 终止酶反应。在第一管中加入 1 毫升底物, 四管继续在  $40^{\circ}C$  保温 10 分钟, 使蛋白质沉淀完全。经过滤, 去除多余的酪蛋白和酶蛋白。各管滤液分别取 1 毫升置另外 4 支试管, 再加入  $0.4MNa_2CO_3$  5 毫升, 福林-酚 0.5 毫升, 处理方法同标准曲线, 测其光密度值。

管号	酶液 (毫升)	TCA (毫升)	酪蛋白 (毫升)	$40^{\circ}C$ 保温 10 分钟	TCA (毫升)	酪蛋白 (毫升)	$40^{\circ}C$ 保温 10 分钟	滤液 (毫升)	$0.4M$ $Na_2CO_3$ (毫升)	福林酚 试剂 (毫升)	迅速混合于 $40^{\circ}C$ 放置 20 分钟	OD <sub>680</sub>
1	1	2	—		—	1		1	5	0.5		
2	1	—	1		2	—		1	5	0.5		
3	1	—	1		2	—		1	5	0.5		
4	1	—	1		2	—		1	5	0.5		

(3) 酶活力计算: 将酶活力测定的光密度值, 在标准曲线上查得相应的酪氨酸的毫克数, 即可按下式计算酶活力

$$\text{蛋白酶活力(单位)} = \text{酪氨酸毫克数} \times \frac{4}{10} \times \text{酶的稀释倍数}$$

式中  $4/10$  的意义是, 活力测定总量为 4 毫升, 而福林-酚试剂显色时仅取 1 毫升, 所以要乘 4。由于酶反应时间为 10 分钟, 而计算酶活力单位为每分钟分解出的酪氨酸毫克数, 故应除以 10。

如果生产和科研工作中需要经常测定蛋白酶活力, 则可在标准曲线制作好后, 求出斜率 K 值, 即可直接从下式求出酶活力:



$$\text{蛋白酶活力(单位)} = \text{酶活力测定的 OD 值} \times K \times \frac{4}{10}$$

× 酶的稀释倍数

K 值求法是，在酪氨酸标准曲线上取 100 微克时的光密度值，再用 100 除，即为 K 值。如标准曲线上相当于 100 微克酪氨酸的 OD 值为 0.95，则  $K = 100/0.95 = 105$ 。

## 46. 脂肪酶活力测定<sup>[30]</sup>

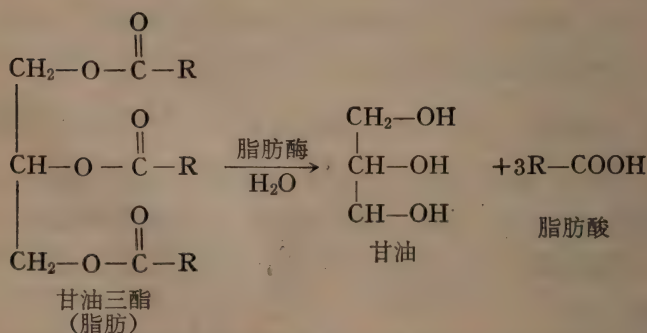
### 一、目的

学习用酸碱滴定的方法测脂肪酶制剂的活力。

### 二、原理

脂肪酶为一种水解酶，在一定条件下，可以把甘油三酯脂肪逐步水解，最后生成甘油及相应的脂肪酸。用已知浓度的标准碱溶液对水解液进行滴定，即可定量求出脂肪酸的量，从而求出脂肪酶活力。

脂肪酶催化反应如下：



在一定条件下，脂肪酶水解脂肪，每分钟产生 1 微克分子脂肪酸的酶量定为一个国际单位。在测定中由于氢氧化钠与

脂肪酸是等当量作用的，因此测定中所耗去的氢氧化钠的微克分子数就是脂肪酸的微克分子数。

### 三、实验材料, 仪器和试剂

#### 1. 实验材料

脂肪酶制剂。

#### 2. 仪器

吸管 1 毫升( $\times 1$ ), 5 毫升( $\times 2$ ); 量筒 50 毫升( $\times 1$ ); 25 毫升碱式滴定管( $\times 1$ ); 烧杯 50 毫升( $\times 1$ ); 三角烧瓶 100 毫升( $\times 3$ ); 容量瓶 250 毫升( $\times 1$ ); 玻棒。

电热恒温水浴箱; 温度计。

#### 3. 试剂

聚乙烯醇(P. V. A)橄榄油乳化液: 称取 40 克聚乙烯醇(聚合度为 1000~1750), 加蒸馏水约 1000 毫升, 水浴加热搅拌至溶。冷却后定容至 1000 毫升, 双层纱布过滤, 备用。取上述 4% 聚乙烯醇溶液 150 毫升, 加 50 毫升橄榄油, 于高速组织捣碎机中搅动 6 分钟(分二次进行), 即成乳白色聚乙烯醇橄榄油乳化液, 冰箱保存。(若贮存后上层有油析出, 需再进行搅动使成均一乳化液。)

0.025M 磷酸缓冲液, pH7.5:

甲液——称取磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 分析纯)17.01 克, 加水定容到 500 毫升。

乙液——称取磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 分析纯)44.77 克, 加水定容到 500 毫升。

取甲液 13 毫升, 乙液 100 毫升混合即成 pH7.5、0.25M 磷酸缓冲液, 再稀释 10 倍即成 pH7.5、0.025M 磷酸缓冲液。

0.05N 氢氧化钠标准溶液: 称取 40 克氢氧化钠(分析纯)加蒸馏水至 1000 毫升, 成为约 1N 的溶液, 经标定浓度后

准确稀释到  $0.05N$ 。

1% 酚酞指示剂: 1 克酚酞溶于 100 毫升 95% 乙醇中。  
95% 乙醇。

#### 四、操作步骤

##### 1. 酶液的制备

精确称取脂肪酶粉 1 克, 在烧杯中以少量蒸馏水调成糊状, 再加水定容到 250 毫升即成稀释 250 倍酶液 (每次稀释倍数视酶活力单位而定)。由于脂肪酶主要附在细胞表面, 很少游离, 因而在浸出液中酶活力很低, 所以测定时需将定容后的酶液摇匀再取样, 切不可过滤后取清液测定。

##### 2. 酶活力测定

加 5 毫升 pH 7.5、 $0.025M$  磷酸缓冲液和 4 毫升聚乙烯醇橄榄油乳化液于三角烧瓶中, 置  $40^{\circ}C$  水浴中预热 10 分钟。加入酶液 1 毫升 (从加入酶液开始精确计时),  $40^{\circ}C$  保温 15 分钟, 立即加入 15 毫升 95% 乙醇中止酶反应。加酚酞指示剂 2~3 滴后以  $0.05N$  氢氧化钠标准溶液滴定到微红色, 记下氢氧化钠溶液的消耗体积。重复二次测定。

##### 3. 对照样品的测定

在已加有 5 毫升 pH 7.5、 $0.025M$  磷酸缓冲液和 4 毫升聚乙烯醇橄榄油乳化液的三角烧瓶内, 先加入 95% 乙醇 15

编号	样品	$0.05N$ 氢氧化钠耗量 (毫升)	$0.05N$ 氢氧化钠平均耗量 (毫升)	脂肪酶活力 (单位/克)
1	对照			
2	酶液			
3	酶液			
4	酶液			

毫升, 然后再加 1 毫升酶液。以酚酞作指示剂,  $0.05N$  氢氧化钠滴定至微红色, 记下所消耗的氢氧化钠溶液体积。

## 五、结果计算

脂肪酶活力单位按下式计算:

$$\text{单位/克} = \frac{(A-B)Nf}{t \cdot w}$$

上式中:  $A$  为酶液样品消耗的  $0.05N$  氢氧化钠毫升数;

$B$  为对照样品消耗的  $0.05N$  氢氧化钠毫升数;

$N$  为每毫升  $0.05N$  氢氧化钠溶液中所含氢氧化钠的微克分子数(为 50);

$f$  为酶粉稀释倍数;

$w$  为测定时所用酶粉的克数;

$t$  为酶作用时间(分)。

例: 某一脂肪酶制剂 1 克稀释 250 倍后, 取 1 毫升按上法测定, 平均耗碱量为 5.90 毫升, 对照耗碱液为 1.40 毫升, 此酶粉的活力如下计算:

$$\begin{aligned}\text{酶活力/克} &= \frac{(5.90 - 1.40) \times 50 \times 250}{15} \\ &= 3000 \text{ 单位/克}\end{aligned}$$

## 47. 蔗糖酶的纯化和比活力测定<sup>[31, 32]</sup>

### 一、目的

学习吸附剂提纯蔗糖酶的基本方法, 正确掌握蔗糖酶比活力测定技术。

### 二、原理

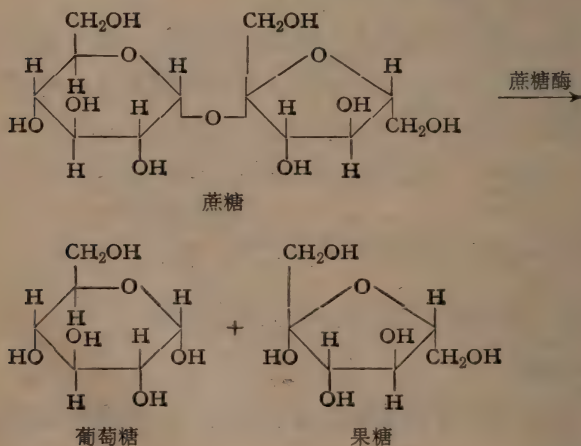
酶的纯化是研究酶的重要步骤, 在多数情况下, 它都是必不可少的。由于酶是蛋白质, 因此常用的分离提纯方法也就



是常用的蛋白质纯化的方法。对于不同来源的各种酶，通常采用盐析沉淀、吸附、离子交换、结晶及各种物理化学方法将它提纯。在纯化过程中，外界各种物理、化学因素往往容易引起酶的失活，因此酶的纯化最好能尽量避免高温、激烈的机械搅拌、强酸、强碱等容易造成蛋白质变性的各种激烈条件。

蔗糖酶在pH6的条件下，能被新鲜制备的铝胶 $[Al(OH)_3]$ 所吸附。通常每1毫克氢氧化铝凝胶能吸附12~36活力单位的蔗糖酶，被吸附的酶保持着原来的活性，并且能够被pH 2.9的缓冲液洗脱下来。

蔗糖酶是一种水解酶，它能使蔗糖水解为果糖和葡萄糖。在20°C下每三分钟能使2.5%蔗糖溶液释放1毫克还原糖的酶量定为一个活力单位。蔗糖酶催化的反应式如下：



因此，只要用一种适当的试剂测定反应中还原糖数量就可以获知它的活力，又由于蔗糖酶在碱性环境中非常容易失活，因此可以用碱来停止酶的作用。

实验中的比活力测定是以每毫克蛋白质含有酶的活力单位数来计算。为适应实验室条件，在  $35^{\circ}\text{C}$  下进行活力测定。蛋白质的浓度测定采用福林-酚试剂方法，同时利用 3,5-二硝基水杨酸与葡萄糖生成红色化合物，通过比色法测定酶反应后生成的还原糖量来测酶活力。

### 三、实验材料, 仪器和试剂

#### 1. 实验材料

0.1% 葡萄糖标准液：精确称取葡萄糖（分析纯）1 克用蒸馏水定容至 1000 毫升。

蛋白质标准溶液：精确称取结晶牛血清白蛋白，以蒸馏水配制成 300 微克/毫升的溶液。（牛血清白蛋白需预先用微量克氏定氮法测定其蛋白含量，然后根据其含量配制标准溶液。）

新鲜酵母；透析袋或透析纸；精密试纸  $\text{pH}0.5\sim5.0$ ；丝线；软木塞。

#### 2. 仪器

吸管 1 毫升( $\times 5$ )，2 毫升( $\times 5$ )，5 毫升( $\times 5$ )，10 毫升( $\times 1$ )；试管  $1.5 \times 15$  厘米( $\times 15$ )；血糖管 25 毫升( $\times 11$ )；离心管 10 毫升( $\times 3$ )，刻度离心管 10 毫升( $\times 1$ )；量筒 10 毫升( $\times 1$ )，50 毫升( $\times 1$ )；三角烧瓶 50 毫升( $\times 1$ )；滴管；玻棒。

72 型分光光度计；温箱；冰箱；离心机；电热恒温水浴箱；水浴锅；台秤；温度计。

#### 3. 试剂

测蛋白试剂甲、乙：见实验 21。

3,5-二硝基水杨酸试剂：见实验 1。

0.1M 醋酸缓冲液， $\text{pH}4.6$ ：0.2M 醋酸溶液(11.55 毫升

冰醋酸定容至 1 升) 25.5 毫升与 0.2M 醋酸钠溶液 (16.4 克 NaAC 或 27.2 克 NaAC·3H<sub>2</sub>O 定容至 1 升) 24.5 毫升混和稀释到 100 毫升。

5% 蔗糖溶液 (W/V): 5 克蔗糖以 pH 4.6 的 0.1M 醋酸缓冲液配成 100 毫升的溶液。

4M 乳酸缓冲液, pH2.9: 4M 乳酸溶液 8 份与 4M 乳酸钠溶液 1 份混合而成, 以 pH 计校正 pH 值到 2.9。

新鲜制备的氢氧化铝凝胶 A: 称取 250 克硫酸铝 [Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>·18H<sub>2</sub>O] 溶于 750 毫升水内, 加温至 55℃ 后把溶液立刻倒入 2.5 升 15% 氨水 (预热至 55℃) 中, 同时用搅拌器剧烈搅拌, 温度将升到 58℃, 此时必须使温度保持在 55~60℃ 之间并连续搅拌半小时。把溶液移到 5 升圆底烧瓶中, 装上回流冷凝器, 回流 48 小时。移入一大瓶内, 加水稀释至 12 升, 用倾泌法洗涤三次。沉淀内加 500 毫升 15% 氨水, 搅拌, 以分解残留的少量的碱或硫酸, 继续以水洗涤, 使连续三次的洗水不再澄清并使沉淀成为凝胶状。

醋酸钠 (化学纯); 甲苯 (化学纯); 4N 醋酸; 1N 氢氧化钠。

#### 四、操作步骤

##### 1. 蛋白质浓度测定的标准曲线制作

取六支试管分别按下表顺序加入 300 微克/毫升牛血清白蛋白溶液与水。加试剂甲 5 毫升, 摇匀后室温放置十分钟, 再加 0.5 毫升试剂乙, 摇匀, 继续放置三十分钟, 650 毫微米处测光密度 (OD) 值。

以蛋白质含量 (微克) 为横坐标, 光密度值为纵坐标作出标准曲线。

##### 2. 葡萄糖浓度测定的标准曲线制作

管号	蛋白质量 (微克)	300微克/毫升蛋白质标准溶液 (毫升)	水 (毫升)	加试剂甲乙50.5毫升，放置10半分钟后	OD <sub>650</sub>
1	0	0	1.0		
2	60	0.2	0.8		
3	120	0.4	0.6		
4	180	0.6	0.4		
5	240	0.8	0.2		
6	300	1.0	0		

取 11 支血糖管，按下表顺序加入 0.1% 葡萄糖溶液、水及 3,5-二硝基水杨酸试剂：

管号	含糖量 (毫克)	0.1%葡萄糖液 (毫升)	水 (毫升)	3,5-二硝基水杨酸试剂 (毫升)	OD <sub>540</sub>
1	0	0	2	1.5	
2	0.2	0.2	1.8	1.5	
3	0.4	0.4	1.6	1.5	
4	0.6	0.6	1.4	1.5	
5	0.8	0.8	1.2	1.5	
6	1.0	1.0	1.0	1.5	
7	1.2	1.2	0.8	1.5	
8	1.4	1.4	0.6	1.5	
9	1.6	1.6	0.4	1.5	
10	1.8	1.8	0.2	1.5	
11	2.0	2.0	0	1.5	

上述试剂混合均匀后在沸水浴中加热 5 分钟，取出立即用冷水冷却，以蒸馏水稀释至 25 毫升，摇匀。测 540 毫微米



光密度(OD)值。

以葡萄糖含量(毫克)为横坐标, 光密度值为纵坐标作出标准曲线。

### 3. 蔗糖酶粗制品的提取

在 50 毫升三角瓶中加入鲜酵母 10 克(若用干酵母, 则加少量水调成糊状), 加 0.8 克醋酸钠, 搅拌 15~20 分钟后团块液化, 加 1.5 毫升甲苯, 用适当的软木塞将瓶口塞住, 摇动 10 分钟, 放入 37℃ 温箱中保温 60 小时。取出后加 1.6 毫升 4N 醋酸和 5 毫升水, 使 pH 为 4.5 左右。混合物 3000 转/分离心半小时, 离心后形成三层, 将中层移入刻度离心管中, 上下层混和后再加 5 毫升水, 摇匀, 3000 转/分离心 30 分钟, 取出中层与第一次合并, 记录总体积。此即为蔗糖酶的粗制品。

吸取 0.5 毫升蔗糖酶的粗制品溶液, 用蒸馏水稀释到 10 毫升, 按下述方法测定比活力。

### 4. 蔗糖酶的比活力测定

(1) 将上述酶液再稀释二倍, 取 0.3 毫升按标准曲线同样操作进行蛋白质浓度测定(以水作对照), 计算出样品中的蛋白质总量(以毫克计算)。

(2) 取二支试管分别加入 2 毫升稀释的酶液。一支做对照管, 加入 0.5 毫升 1N NaOH, 摇匀, 使酶失活; 另一支做测定管。此二支试管和 5% 蔗糖溶液放在 35℃ 水浴中预热 10 分钟。分别吸取 2 毫升 5% 的蔗糖液于上述二试管中, 并且正确计算时间, 3 分钟后在测定管中也加入 0.5 毫升 1N NaOH, 摇匀(整个反应过程在 35℃ 下进行)。从反应混合物中取出 0.45 毫升溶液用 3, 5-二硝基水杨酸试剂测定酶反应生成的还原糖数量(方法同标准曲线的制作), 计算出所有的酶在 35℃ 下, 以 5% 蔗糖为底物时, 3 分钟能释放出的还原糖

总的毫克数,此即总活力单位(A)。

以总蛋白质质量为分母,总活力单位数为分子,计算每毫克蛋白质所含的活力单位,即比活力(A/毫克)。

#### 5. 蔗糖酶在铝胶 $[\text{Al}(\text{OH})_3]$ 上的吸附和洗脱

(1) 吸附: 将酶的粗制品稀释成 100 单位/毫升左右的溶液,取 3 毫升置于离心管中,加入等体积的  $\text{Al}(\text{OH})_3$ 。搅拌 15 分钟后放入冰箱。次日离心,分出上清液,沉淀用 5 毫升水洗涤一次,离心后吸出上清液与第一次上清液合并。同前法测定上清液的比活力。

(2) 洗脱: 上述沉淀用 3 毫升 4M pH 2.9 乳酸-乳酸钠缓冲液搅拌抽提 30 分钟,3000 转/分离心 15 分钟,移出上清液,沉淀复用 2 毫升缓冲液洗提 15 分钟,离心后弃去沉淀。合并二次上清液,对水透析 24 小时。得到的透明液体即为提纯的酶液,测定其比活力。

### 五、结果计算

根据粗酶液和提纯的酶液的总活力及比活力,计算蔗糖酶提纯的总回收率以及纯化倍数。

计算式如下:

$$\text{总回收率} = \frac{\text{提纯酶总活力}}{\text{粗酶液总活力}}$$

$$\text{纯化倍数} = \frac{\text{提纯酶比活力}}{\text{粗酶液比活力}}$$

## 48. 蔗糖酶进程曲线的制作及不同酶浓度对反应速度的影响

### 一、目的

寻找在一定条件下测定蔗糖酶活力的初速度时间范围,

并了解它的意义。

## 二、原理

酶是生物体内一系列复杂的生化反应中的催化剂，它的特殊功能是加速体内化学反应的进行。研究酶作用的反应速度规律，即酶作用的动力学，是酶学中最重要内容之一。酶动力学的研究不仅有助于寻找酶活力测定的最适条件及分离提纯的条件，而且对于深入了解酶在机体中的作用及阐明酶的作用机制具有积极的意义。

酶的活力测定是研究酶反应速度规律的最基本环节。测定酶的活力实质上就是测定酶所催化的反应速度，通常用单位时间内底物的减少或产物的增加来表示。酶反应过程中产物的生成和时间关系可用图 30 的进程曲线来说明，曲线的斜率就是酶反应过程中的反应速度。从进程曲线可看出，在一定时间内反应速度维持恒定，但随着时间的延续，反应速度逐渐降低。这是由于产物浓度的增加使反应的逆过程加速以及产物的累积可能导致 pH 变化、酶的失活等原因造成。所以为了准确表示酶的反应速度就必须采用初速度即维持恒定时的速度。

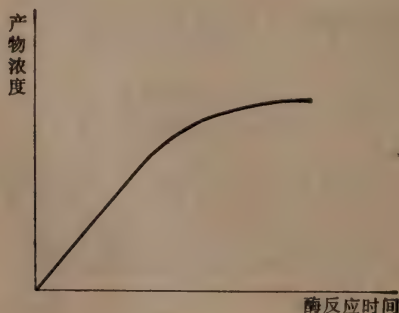


图 30 蔗糖酶的进程曲线

采用初速度来表示酶活力的重要性，还可以用酶浓度不同时的反应过程加以说明(图 31)。从图中可见，只有取反应过程成直线的部分来计算反应速度(初速度)时，才能得到反应速度和酶量成正比关系。

蔗糖酶在一定酶浓度和底物浓度情况下，表现出与上述相同的性质。

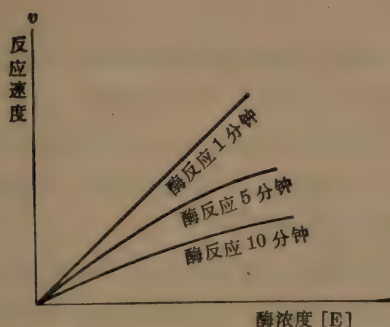


图 31 酶反应不同时间[E]与  $v$  作图

### 三、实验材料, 仪器和试剂

#### 1. 实验材料

蔗糖酶的粗酶液：实验 47 中提取所得。

#### 2. 仪器

吸管 1 毫升( $\times 5$ ), 2 毫升( $\times 5$ ), 10 毫升( $\times 2$ ); 血糖管( $\times 32$ ); 试管  $1.5 \times 15$  厘米( $\times 32$ ); 烧杯 50 毫升( $\times 2$ ); 三角烧瓶 100 毫升( $\times 1$ )。

72 型分光光度计; 电热恒温水浴箱; 水浴锅; 定时钟; 温度计。

#### 3. 试剂

3, 5-二硝基水杨酸试剂：见实验 1。



0.5%蔗糖溶液：以 pH4.6、0.1M 醋酸缓冲液(见实验 47)配制。

1N NaOH。

#### 四、操作步骤

##### 1. 蔗糖酶进程曲线的制作

(1) 取 12 支试管依次编号, 每管内先加入 0.25 毫升 1N NaOH 溶液。

(2) 用蒸馏水将酶提取液稀释成 3 单位/毫升, 取 20 毫升置于 100 毫升三角瓶中, 35°C 保温 10 分钟, 加入在 35°C 下预热的 0.5% 蔗糖液 20 毫升, 摇匀后立即从中吸出 2 毫升混合液注入“0”号试管内, 摇匀作为对照, 同时把三角烧瓶放入 35°C 水浴中保温, 记录时间。

(3) 按下页表保温 3、6、9、12……分钟时, 吸取 2 毫升蔗糖酶反应混合物分别注入相应的已加入 0.25 毫升 1N NaOH 溶液的 1、2、3、4……号试管中, 摇匀中止酶反应。在上述每一试管中吸出 0.5 毫升溶液分别注入相应的盛有 1.5 毫升 3,5-二硝基水杨酸试剂的血糖管中, 加蒸馏水 1.5 毫升。沸水浴加热 5 分钟, 冷水冷却后以蒸馏水稀释至 25 毫升, 摇匀。读取 540 毫微米处光密度(OD) 值。从葡萄糖浓度测定标准曲线(见实验 47)查出酶解产物量。

以反应时间为横坐标, 产物量为纵坐标作出进程曲线。求出本实验的初速度时间范围。

##### 2. 不同酶浓度对反应速度的影响

(1) 将酶提取液稀释至 5 单位/毫升。取 20 支试管, 分成四组。每组按表编号并加入蒸馏水和酶液, 置于 35°C 水浴中预热 10 分钟。其中一组试管内先加入 1N NaOH 溶液 0.5 毫升以作对照用。

管号	间隔 时间 (分)	1N NaOH (毫升)	0.5% 蔗糖+酶 (毫升)	吸取 混合液 (毫升)	3,5-二硝 基水杨酸 试剂 (毫升)	水 (毫升)	OD <sub>540</sub>	产物量 (毫克)
0	0	0.25	2	0.5	1.5	1.5		
1	3	0.25	2	0.5	1.5	1.5		
2	6	0.25	2	0.5	1.5	1.5		
3	9	0.25	2	0.5	1.5	1.5		
4	12	0.25	2	0.5	1.5	1.5		
5	15	0.25	2	0.5	1.5	1.5		
6	20	0.25	2	0.5	1.5	1.5		
7	25	0.25	2	0.5	1.5	1.5		
8	30	0.25	2	0.5	1.5	1.5		
9	40	0.25	2	0.5	1.5	1.5		
10	50	0.25	2	0.5	1.5	1.5		
11	60	0.25	2	0.5	1.5	1.5		

编 号	1	2	3	4	5
5单位/毫升酶液(毫升)	0.4	0.8	1.2	1.6	2
水(毫升)	1.6	1.2	0.8	0.4	0
酶活力单位数	2	4	6	8	10

(2) 各管内分别加入已预热的 0.5% 蔗糖液 2 毫升，立即摇匀，35℃下保温，记取反应开始时间。

(3) 三组分别在 37℃保温 5、10、15 分钟后依次加入 0.5 毫升 1N NaOH，摇匀中止酶反应。

(4) 从上述每一试管中吸取 0.5 毫升加入到相应的盛有 1.5 毫升 3,5-二硝基水杨酸试剂的血糖管中, 再加 1.5 毫升水, 沸水浴加热 5 分钟, 冷水冷却, 稀释至 25 毫升, 摇匀后于 540 毫微米处读取光密度值。计算出反应速度(毫克/5 分钟), 将数值填入下表。

项 目		1	2	3	4	5
保温 5 分钟	OD <sub>540</sub>					
	V (毫克/5分)					
保温10分钟	OD <sub>540</sub>					
	V (毫克/5分)					
保温20分钟	OD <sub>540</sub>					
	V (毫克/5分)					

以酶活力单位数作横坐标, 反应速度作纵坐标作图。

根据所作的图求出在本实验条件下的初速度。

## 49. 蔗糖酶的米氏常数( $K_m$ )和

### 最适 pH 测定

#### 一、目的

了解底物浓度与酶反应速度之间的关系以及 pH 对酶活力测定的影响, 学习求蔗糖酶米氏常数和最适 pH 的方法。

#### 二、原理

米切利斯(Michaelis)运用酶反应过程中形成中间络合物的学说, 导出了有名的米氏方程。这个方程直接地给出了酶反应的速度和酶浓度、底物浓度的关系, 这个方程还给出了一

个非常重要的物理常数——米氏常数  $K_m$ 。对于每一个酶促反应，在一定条件下都有它特定的  $K_m$  值，因此常可用于鉴别酶。米氏方程和米氏常数对于研究酶作用的动力学有很大的意义。米氏方程式如下：

$$v = \frac{V[S]}{K_m + [S]}$$

式中： $v$  为反应速度，  
 $[S]$  为底物浓度，  
 $K_m$  为米氏常数，  
 $V$  为最大反应速度。

由上式可见，当  $v = \frac{1}{2}V$  时， $K_m$  就等于底物浓度  $[S]$ 。基于这一点，测定不同底物浓度时的酶反应速度，利用作图法求出最大速度，在  $\frac{1}{2}V$  处的相应位置上就可以求出  $K_m$  的近似值（见图 32）。

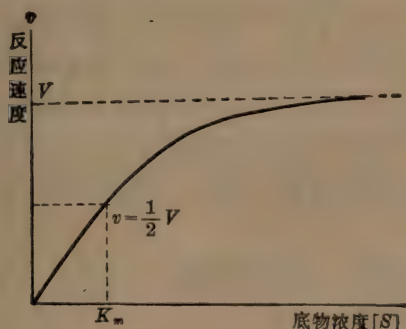


图 32  $[S]$  与  $v$  作图

如果将米氏方程的形式改变成下述直线方式：



$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V}$$

以  $\frac{1}{v}$  为纵坐标,  $\frac{1}{[S]}$  为横坐标作图。所得直线的截距是  $\frac{1}{V}$ , 斜率为  $K_m/V$  (见图 33)。用 Linewerver-Burk 作图法作图后可方便地求出  $K_m$  值。蔗糖酶的米氏常数为 16 毫克分子。

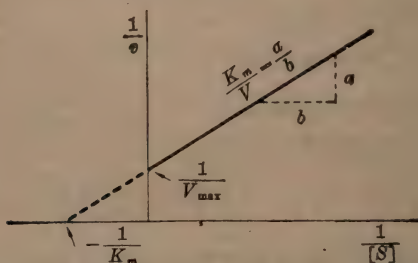


图 33  $\frac{1}{[S]}$  与  $\frac{1}{v}$  作图

pH 对酶的活力影响很大, 通常在某一 pH 范围内酶表现出最大的活力, 此时的 pH 值就是这酶的最适 pH。不同来源的蔗糖酶最适 pH 也各不相同, 其中酵母的蔗糖酶最适 pH 范围在 pH3.5~5.5 之间, 而以 pH4.5 为最好。通过酶与一系列不同 pH 底物的反应速度测定可求出最适 pH。它对于寻找酶的分离纯化条件与活力测定最适条件亦具有积极的意义。

### 三、实验材料, 仪器和试剂

#### 1. 实验材料

2 单位/毫升、3 单位/毫升、5 单位/毫升的蔗糖酶溶液: 取实验 47 制备的酶液稀释而成。

#### 2. 仪器

吸管 1 毫升( $\times 5$ ), 2 毫升( $\times 6$ ); 试管  $1.5 \times 15$  厘米( $\times 23$ ); 血糖管( $\times 23$ )。

72 型分光光度计; 电热恒温水浴箱; 水浴锅; 定时钟; 温度计。

### 3. 试剂

0.1M 醋酸缓冲液, pH4.6: 见实验 47。

0.5% 蔗糖溶液: 以 pH4.6、0.1M 醋酸缓冲液配制。

0.1M、0.2M 蔗糖溶液: 以 pH4.6、0.1M 醋酸缓冲液配制。

不同 pH 的 0.5% 蔗糖溶液: 0.1M 柠檬酸溶液 (19.21 克/升) 和 0.2M 磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  53.65 克/升或  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  71.7 克/升) 按下表量混合并稀释至 100 毫升, 以此不同 pH 缓冲液配制 5% 的蔗糖溶液。

pH	0.1M 柠檬酸 (毫升)	0.2M 磷酸氢二钠 (毫升)
2.6	44.6	5.4
3.6	33.9	16.1
4.6	25.3	24.8
5.6	21.0	29.0
6.6	13.6	36.4

3,5-二硝基水杨酸试剂: 见实验 1。

1N NaOH。

### 四、操作步骤

#### 1. 米氏常数 $K_m$ 的测定

(1) 按下表在 12 支试管中分别加入 0.1M 蔗糖液和 pH

管号	反 应 物				活 力 测 定				数 据 计 算			
	0.1M 蔗糖液 (毫升)	pH4.6醋 酸缓冲液 (毫升)	3单位/ 毫升酶液 (毫升)	1N NaOH (毫升)	吸 取 反应物 (毫升)	水杨酸 试 剂 (毫升)	水 (毫升)	OD <sub>540</sub>	底物浓度 (M)	1/M	速 度 (v)	1/v
1	0	2.00	2.00	0.50	0.50	1.50	1.50	沸水浴加热5分钟,冷却以水稀释至25毫升	0	—	0	—
2	0.20	1.80	2.00	0.50	0.50	1.50	1.50		0.005	200		
3	0.25	1.75	2.00	0.50	0.50	1.50	1.50		0.00625	160		
4	0.30	1.70	2.00	0.50	0.50	1.50	1.50		0.0075	133.3		
5	0.35	1.65	2.00	0.50	0.50	1.50	1.50		0.00875	114.3		
6	0.40	1.60	2.00	0.50	0.50	1.50	1.50		0.010	100		
7	0.50	1.50	2.00	0.50	0.50	1.50	1.50		0.0125	80		
8	0.60	1.40	2.00	0.50	0.50	1.50	1.50		0.015	66.7		
9	0.80	1.20	2.00	0.50	0.50	1.50	1.50		0.02	50		
10	1.00	1.00	2.00	0.50	0.50	1.50	1.50		0.025	40		
11	1.50	0.50	2.00	0.50	0.50	1.50	1.50		0.0375	26.7		
12	2.00	0	2.00	0.50	0.50	1.50	1.50		0.050	20		

4.6、0.1M醋酸缓冲液使总体积达2毫升，置于35°C水浴内预热，另取3单位/毫升酶溶液在35°C水浴中保温10分钟。依次向各试管中加入2毫升酶液，准确作用五分钟后按次序加入0.5毫升1N NaOH，摇匀，中止酶反应。吸取0.5毫升酶反应液，加入盛有1.5毫升3,5-二硝基水杨酸试剂的血糖管中，并加1.5毫升水。沸水浴加热五分钟后立即用冷水冷却。用蒸馏水稀释至25毫升，摇匀，读取540毫微米处光密度(OD)值。

以 $1/M$ 作横坐标， $1/v$ 作纵坐标作图，求出最大反应速度 $V$ 和米氏常数 $K_m$ 。

(2) 另取11支试管按下表加入0.2M蔗糖溶液和pH4.6醋酸缓冲液，使总体积达2毫升，置35°C水浴内预热，然后依

管号	0.2M 蔗糖液 (毫升)	pH4.6 醋酸 缓冲液 (毫升)	2单位/ 毫升酶液 (毫升)	1N NaOH (毫升)	吸取0.5 毫升反应 物的 OD <sub>540</sub>	底物浓度 M	反应 速度 v
1	0	2.00	2.00	0.50		0	
2	0.10	1.90	2.00	0.50		0.005	
3	0.20	1.80	2.00	0.50		0.01	
4	0.30	1.70	2.00	0.50		0.015	
5	0.40	1.60	2.00	0.50		0.02	
6	0.60	1.40	2.00	0.50		0.03	
7	0.80	1.20	2.00	0.50		0.04	
8	1.00	1.00	2.00	0.50		0.05	
9	1.20	0.80	2.00	0.50		0.06	
10	1.60	0.40	2.00	0.50		0.08	
11	2.00	0	2.00	0.50		0.10	



次加入已预热的 2 单位/毫升蔗糖酶溶液,按上述同样方法进行测定。

以底物浓度为横坐标,反应速度为纵坐标作图,求出最大速度  $V$  与米氏常数  $K_m$ 。

## 2. 最适 pH 的测定

按下表在 6 支试管中加入不同 pH 的 0.5% 蔗糖液 2 毫升,35°C 水浴预热。1 号管作对照,先加 0.5 毫升 1N NaOH。然后依次加入已预热的 5 单位/毫升酶液(以不同 pH 缓冲液稀释)2 毫升,准确作用五分钟后在 2~6 号管中依次加入 0.5 毫升 1N NaOH,摇匀,中止酶反应。吸取上述酶反应液 0.5 毫升加到盛有 1.5 毫升 3,5-二硝基水杨酸试剂的血糖管中,加 1.5 毫升水,沸水浴保温五分钟后立即用冷水冷却,以蒸馏水稀释至 25 毫升,摇匀,读取 540 毫微米处光密度(OD)值。

管号	pH	0.5% 蔗糖液 (毫升)	5单位/ 毫升 酶液 (毫升)	1N NaOH (毫升)	吸 取 混合物 (毫升)	水杨酸 试剂 (毫升)	水 (毫升)	OD <sub>540</sub>	产物量 (毫克)
1	4.6	2.00	2.00	0.50	0.50	1.50	1.50		
2	2.6	2.00	2.00	0.50	0.50	1.50	1.50		
3	3.6	2.00	2.00	0.50	0.50	1.50	1.50		
4	4.6	2.00	2.00	0.50	0.50	1.50	1.50		
5	5.6	2.00	2.00	0.50	0.50	1.50	1.50		
6	6.6	2.00	2.00	0.50	0.50	1.50	1.50		

以 pH 为横坐标,产物量为纵坐标作图,找出蔗糖酶的最适 pH。

## 50. $\alpha$ -半乳糖苷酶酶学性质测定<sup>[33,36]</sup>

通过  $\alpha$ -半乳糖苷酶某些酶学性质的测定, 初步掌握一般酶反应动力学的实验方法, 为自行设计任何一种酶的酶学性质测定方案打下一定基础。

具体要求掌握下列基本分析方法: 进程曲线的制作, pH 和温度对酶活性的影响, 酸碱稳定性和热稳定性, 米氏常数的测定, 抑制剂类型的判断。

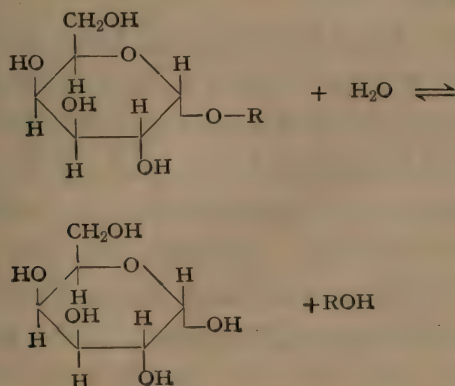
### I. 进程曲线的制作

#### 一、目的

通过进程曲线的制作, 求出反应初速度的时间范围, 这是后面几个实验进行初速度测定时的根据。

#### 二、原理

本实验所选用的  $\alpha$ -半乳糖苷酶 [ $\alpha$ -D-galactosidase, E. C.3.2.1.22] 能专一水解非还原性末端的  $\alpha$ -D-半乳糖残基, 可用下式表示:



这里选用的底物是邻-硝基苯半乳糖苷( $\alpha$ -ONPG), 反应如下:



当底物 $\alpha$ -ONPG经酶催化反应后, 生成的产物邻-硝基酚呈现黄色, 可在 420 毫微米进行光吸收测定。在一定条件(温度、pH) 下, 每分钟生成 1 微克分子邻-硝基酚所需要的酶量定为一个单位。

进程曲线表明反应时间和底物或产物化学反应量之间的关系。由进程曲线可以了解酶反应随时间的变化情况, 并求得酶反应的初速度。本实验在反应的最适条件 (pH 7, 65°C), 有一定酶量和足够底物量条件下, 测出一系列不同时间的相对产物变化量。以反应时间为横坐标, 相对产物变化量为纵坐标, 绘制出进程曲线。进程曲线的起始直线部分表示反应初速度, 由此可求出代表初速度的适宜反应时间。酶的活性测定及酶反应动力学的实验都必须测定反应的初速度, 所以通过进程曲线的制作所求出的代表初速度的反应时间范围是我

们后面一系列实验的基础。

### 三、实验材料, 仪器和试剂

#### 1. 实验材料

$\alpha$ -半乳糖苷酶溶液: 称取一定量酶制剂, 用蒸馏水配成 10 毫克/毫升的溶液。测定前用 0.1M、pH 7 磷酸盐缓冲液再适当稀释之 (酶溶液稀释倍数应使  $OD_{420} < 0.8$  的范围内)。

#### 2. 仪器

试管  $1.5 \times 15$  厘米 ( $\times 20$ ); 吸管 0.5 毫升 ( $\times 2$ ), 1 毫升 ( $\times 1$ )。

721 型分光光度计; 电热恒温水浴箱; 时钟; 温度计。

#### 3. 试剂

2m MONPG 溶液: 12.04 毫克 ONPG, 加 0.1M、pH 7 磷酸盐缓冲液至 20 毫升。

1M  $Na_2CO_3$  溶液: 53 克无水碳酸钠加蒸馏水至 500 毫升。

0.1M、pH 7 磷酸盐缓冲液: 6.08 克  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$  和 21.85 克  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  加蒸馏水至 1000 毫升。

### 四、操作步骤

取 18 支试管, 分别加入 0.5 毫升 2m MONPG 溶液, 在  $65^\circ C$  恒温水浴中预热 5 分钟, 精确计时, 于各管内分别加入 0.5 毫升酶溶液, 然后按时间间隔 5、10、15、20、25、30、40、50 和 60 分钟的要求加入 1 毫升 1M  $Na_2CO_3$  溶液中止反应 (每组并列二支)。

空白管以 0.5 毫升缓冲液代替酶, 其他步骤相同。

全部反应结束后, 以空白管作对照在 721 型分光光度计上于 420 毫微米下测定光密度值。



反应时间 (分钟)	5	10	15	20	25	30	40	50	60
OD <sub>420</sub>									

## 五、结果分析

以反应时间为横坐标, OD<sub>420</sub>为纵坐标作出进程曲线。

由进程曲线求出代表初速度的适宜反应时间。

## Ⅱ. pH 对酶活性的影响及酸碱

### 稳定性测定

#### 一、目的

通过 pH 对酶活性影响的测定求出该酶表现活性的最适 pH 范围, 由酸碱稳定性的测定了解该酶所稳定的酸碱范围。

#### 二、原理

pH 对酶反应的速度有显著的影响, 每一种酶都有一个特定的 pH 值, 在此 pH 值下的反应速度最快, 而在此最适 pH 的两侧反应速度都比较慢。因此, 进行酶反应的实验都必需加合适的缓冲液以控制 pH 值。另外, pH 对酶活性的关系还可以为酶作用机制的研究提供有用的资料。因为酶是二性电解质, 具有许多解离基团, 酶的功能和某些特殊基团有关, 某一特定的酶要表现活性, 某种基团必须以非解离状态存在, 或另一些酶中则要求以离子状态存在。通过比较 pH 对酶活性的影响, 以及蛋白质中可滴定基团的 pK 值, 就可能推测出酶分子可能参与催化作用的基团是什么。pH 对酶活性的影响除了通过酶分子作用外, 也可以通过对底物分子的解离作用, 或其他间接的作用影响酶的反应速度。

pH-酶活性关系的测定是在其他条件 (例如底物浓度、

酶浓度、反应温度等)恒定的最适情况下,于一系列变化的pH里进行初速度的测定。通过绘制pH-初速度坐标图,往往可以得到钟形的曲线。在设计实验方案时,要注意缓冲液成分不对分析有干扰。不同范围的pH有时选用不同成分的缓冲液往往对酶活性有不同的影响。这里我们选用广范围的缓冲液系统可以消除这方面的影响。

酶象其他蛋白质一样,只有在有限的pH范围里才是稳定的,大多数酶往往在中性pH下是稳定的。通过酶的酸碱稳定性的测定可以了解该酶所稳定的pH范围。

酸碱稳定性测定时,把酶先放在一系列的不同pH缓冲液里(一定温度,一定时间),然后在最适pH下进行初速度测定。在设计实验方案时,要注意前一系列的pH缓冲液浓度应该尽量低,而后一pH缓冲液的浓度应该足够保证各组在测定时达到最适pH值。

### 三、实验材料,仪器和试剂

#### 1. 实验材料

$\alpha$ -半乳糖苷酶溶液:同实验50I配制的10毫克/毫升的酶溶液。测定前用蒸馏水再适当稀释之。

#### 2. 仪器

试管  $1.5 \times 15$  厘米( $\times 34$ ); 吸管 0.1 毫升( $\times 2$ ), 0.5 毫升( $\times 4$ ), 1 毫升( $\times 2$ ), 10 毫升( $\times 1$ ); 微量进样器100微升( $\times 1$ )。

721 型分光光度计; 电热恒温水浴箱; 时钟; 温度计。

#### 3. 试剂

10m M ONPG 水溶液: 60.2 毫克 ONPG 加水至 20 毫升。

2m M ONPG 溶液: 同实验 50 I, 用 pH7 缓冲液配制。

1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液: 同实验 50 I。

0.1M, pH7 磷酸盐缓冲液: 同实验 50 I。

各组缓冲液配制如下:

原液甲: 柠檬酸 6.008 克, 磷酸二氢钾 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 3.893 克, 硼酸 ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) 1.769 克, 巴比妥 5.266 克, 加蒸馏水至 1000 毫升。

原液乙: 0.2N NaOH 溶液。

按下列比例配制, 分别用 pH 计校正。

pH	3	4	5	6	7	8	9	10
原液甲	100	100	100	80	80	80	60	60
原液乙	6.4	15.6	27.1	31.1	40.4	50.8	43.6	48.4

#### 四、操作步骤

##### 1. pH 与酶活性关系的测定

取试管 17 支, 编号 1~8 每种 pH 做二支, 空白一支。各管加 0.1 毫升 10m M ONPG 水溶液, 再按下表加入不同 pH 的缓冲液 0.4 毫升, 摇匀。于 65°C 恒温水浴箱内逐管计时加入酶水溶液 0.5 毫升, 摇匀。各管精确反应 15 分钟后加入 1 毫升 1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液, 冷却后以空白管(以水代酶, 其他操作相同)作对照, 在 721 型分光光度计于 420 毫微米下测出  $\text{OD}_{420}$  值。数据填入下表:

管 号	1	2	3	4	5	6	7	8
反应pH	3	4	5	6	7	8	9	10
$\text{OD}_{420}$								

以反应 pH 为横坐标,  $OD_{420}$  为纵坐标, 绘制 pH-酶活性曲线, 并分析在本实验条件下该酶的最适 pH 范围。

## 2. 酸碱稳定性的测定

取试管 17 支, 编号 1~8, 每种 pH 做二支, 空白一支。各管按下表加 0.1 毫升不同 pH 的缓冲液, 用微量进样器加入 0.1 毫升酶水溶液, 摇匀,  $65^{\circ}\text{C}$  保温 1 小时。

保温终了, 各管加入 0.3 毫升  $0.1\text{M}$  pH7 磷酸盐缓冲液, 摇匀。

于  $65^{\circ}\text{C}$  恒温水浴锅内逐管计时加入 0.5 毫升  $2\text{mM}$  ONPG 溶液(pH 7 缓冲液配), 精确反应 15 分钟, 加入 1 毫升  $1\text{M}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液, 冷却后, 以空白管(以水代替酶, 其他操作相同)作对照, 在 721 型分光光度计于 420 毫微米下测出光密度值。数据填入下表。

管 号	1	2	3	4	5	6	7	8
处理的pH	3	4	5	6	7	8	9	10
$OD_{420}$								

以处理的 pH 为横坐标,  $OD_{420}$  为纵坐标, 绘制 pH 稳定曲线, 并分析在本实验条件下该酶的酸碱稳定范围。

## Ⅲ. 温度对酶活性的影响及 热稳定性测定

### 一、目的

通过温度对酶活性影响的测定, 求出该酶表现活性的适宜温度范围, 由热稳定性的测定了解该酶的耐热程度。



## 二、原理

温度对酶反应的影响表现在：随着温度的增高反应速度也加快，直至达到最大值；温度再升高时，反应速度随着温度的增高而减慢。温度有双重性影响，温度的升高一方面加快催化反应速度，另一方面促使酶蛋白的变性，是两种对抗效应的综合效果。测定酶活性时，应该取酶反应的最适温度。

温度与酶活性的关系测定方法与前一实验相似，只要把其他条件（例如底物浓度、酶浓度和 pH 等）固定在最适状态下，然后在温度一系列变化条件下进行初速度测定。通过绘制温度-初速度坐标图，可以得到温度-酶活性曲线。

酶是蛋白质，它像其他蛋白质一样，温度增高会使酶变性，因此酶有一定的热稳定范围。酶往往在其起功能作用的生理条件下是最稳定的，例如耐热的细菌含有高温下稳定的酶。另外，酶的热稳定范围和测定时的条件有很大关系，例如 pH、是否有底物存在、离子强度等都有影响。

酶的热稳定性也是容易测定的，只要把酶在不同温度下处理一段时间，然后在最适温度下进行初速度测定。

应该注意，通过上述测定所得出的最适温度及热稳定范围都是有条件的，这个条件就是实验分析时的条件，不能推论至一切情况。

## 三、实验材料、仪器和试剂

### 1. 实验材料

$\alpha$ -半乳糖苷酶溶液：同实验 50 I 配制的 10 毫克/毫升的酶水溶液。测定前用 0.1M pH7 磷酸盐缓冲液再适当稀释之。

### 2. 仪器

试管 1.5×15 厘米(×32)；吸管 0.5 毫升(×2)，1 毫升

( $\times 1$ )。

721型分光光度计; 电热恒温水浴箱( $\times 6$ ); 温度计( $\times 6$ )。

### 3. 试剂

2m M ONPG 溶液: 同实验 50 I, 用 pH7 缓冲液配制。

1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液: 同实验 50 I。

## 四、操作步骤

### 1. 温度与酶活性关系的测定

取试管 13 支, 编号 1~6, 每种温度二支, 空白一支。各管内加 0.5 毫升 2 m M ONPG 溶液, 置于各种不同温度(40, 50, 60, 65, 70, 75°C)的恒温水浴箱内。逐管计时加入 0.5 毫升酶液, 精确反应 15 分钟后加入 1 毫升 1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液, 冷却后以空白管(以水代替酶, 其他操作步骤相同)作对照, 在 721 型分光光度计于 420 毫微米下测出  $\text{OD}_{420}$  值。数据填入下表:

管 号	1	2	3	4	5	6
反应温度°C	40	50	60	65	70	75
$\text{OD}_{420}$						

以反应温度为横坐标,  $\text{OD}_{420}$  为纵坐标, 绘制温度-酶活性曲线, 并分析该酶在本实验条件下的最适温度范围。

### 2. 热稳定性的测定

热处理条件取 60, 65 和 75°C 三种。每种温度处理时间为 15, 30 和 60 分钟三种。

取试管 19 支, 编号 1~9, 每种温度、时间各二支, 空白一支。各支内加 0.5 毫升酶液, 分别置于相应温度的恒温水浴箱内, 每经过 15, 30 和 60 分钟各取出 2 支。

全部热处理完后, 在  $65^{\circ}\text{C}$  下进行初速度测定。即逐管计时加入 0.5 毫升  $2\text{ mM}$  ONPG 液, 精确反应 15 分钟, 加  $1\text{ M}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 毫升中止反应, 冷却后以空白管(以水代替酶, 余同)作对照, 在 721 型分光光度计于 420 毫微米测定  $\text{OD}_{420}$  值。将数据填入下表:

管号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
热处理温度 $^{\circ}\text{C}$	$65^{\circ}\text{C}$			$70^{\circ}\text{C}$			$75^{\circ}\text{C}$		
热处理时间(分钟)	15	30	60	15	30	60	15	30	60
$\text{OD}_{420}$									

以处理温度为横坐标,  $\text{OD}_{420}$  为纵坐标, 绘制热稳定性曲线图。

## IV. 米氏常数测定

### 一、目的

测定  $\alpha$ -半乳糖苷酶以 ONPG 或棉籽糖为底物时的米氏常数。

### 二、原理

米氏常数  $K_m$  等于达到反应最大速度一半时的底物浓度, 具有浓度的单位 ( $M$ )。对于每一种酶-底物体系来说,  $K_m$  是一个特性值, 它和酶浓度无关, 但和 pH、温度或其他因素有关。如果同一个酶能够作用于几个底物, 那么  $K_m$  值往往可用来比较酶和各种底物亲和力的大小。 $K_m$  的数值小(大)说明底物与酶之间的亲和力强(弱)。

$K_m$  值通过实验测定, 可在一系列底物浓度下测定反应初速度, 即测出作为底物浓度函数的反应速度 (酶的相对活性), 通过作图而求得  $K_m$ 。

最常用的是 Lineweaver-Burk 的倒数作图法。其根据是将米氏方程  $v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$  进行重排, 变成如下形式:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

$\frac{1}{v}$  对  $\frac{1}{[S]}$  作图得出一条直线, 直线在横轴上的截距为  $-\frac{1}{K_m}$ ,

在纵轴上的截距为  $\frac{1}{V_{\max}}$  (见实验 49, 图 33)。

近年来, Eissenthal 和 Cornish-Bowden 介绍用直接线性作图法, 这个方法十分简单、快速, 不必进行计算就可以直接利用数据作图。其根据是将米氏方程改写为:

$$\frac{V}{v} - \frac{K_m}{[S]} = 1$$

根据此式, 在给定的  $[S]$  上可测得  $v$ , 在坐标上截取  $[S]$  和  $v$  并

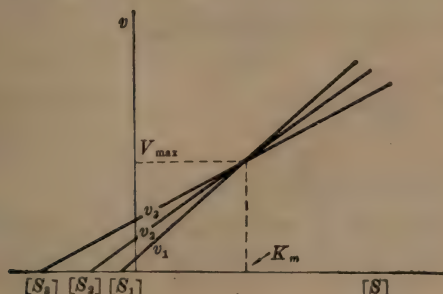


图 34(a) Eissenthal 作图法



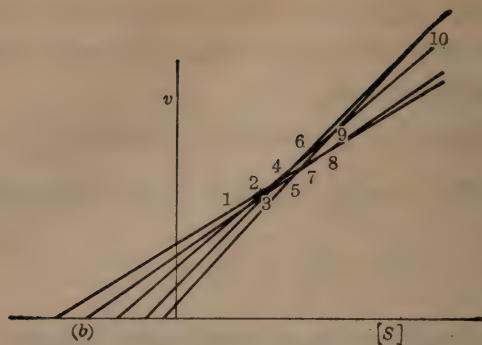
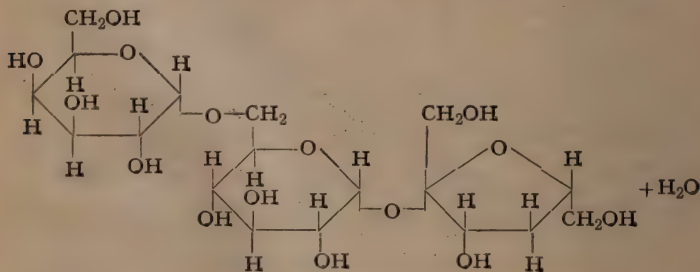


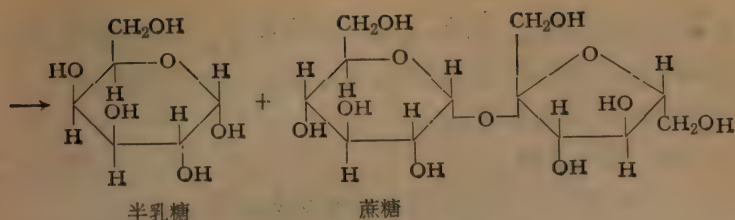
图 34(b) Eisenthal 作图法

连接二点成一直线，通过一系列  $[S]$  和  $v$  连成的直线在座标的第一象限内的交叉点可求得  $K_m$  (和  $V_{\max}$ )，见图 34 (a)。在实际测定时常有误差，得不到唯一的交叉点，则可由每组点的中值得出  $K_m$  的最佳值。例如，如果有 5 个实验点，由五条直线得到十个交点，则可取第 5 至第 6 点之间的中值(图 33 b)。

本实验选用的底物有二种：邻-硝基苯半乳糖苷及棉籽糖。棉籽糖经酶催化反应后，产物中的半乳糖具有还原性，用 Nelson-Somogyi 法进行还原糖测定。



棉籽糖



在一定条件(pH, 温度)下, 每分钟释放 1 微克分子半乳糖所需要的酶量为一个酶活性单位。

### 三、实验材料, 仪器和试剂

#### 1. 实验材料

$\alpha$ -半乳糖苷酶溶液: 同实验 50 I, 适当稀释。

#### 2. 仪器

试管 1.5 × 15 厘米(× 42); 吸管 0.5 毫升(× 4), 1 毫升(× 3), 2 毫升(× 3)。

721 型分光光度计; 电热恒温水浴箱; 水浴锅; 时钟; 温度计。

#### 3. 试剂

0.1M pH7 磷酸缓冲液: 同实验 50 I。

2m M ONPG 溶液: 同实验 50 I。

1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液: 同实验 50 I。

100m M 棉籽糖溶液: 1.189 克棉籽糖, 用 0.1M pH7 磷酸盐缓冲液加至 20 毫升。

铜试剂: (I) 无水碳酸钠 24 克, 酒石酸钾钠 12 克, 碳酸氢钠 16 克, 硫酸钠 144 克, 溶解于 800 毫升水中;

(II) 4 克硫酸铜, 36 克硫酸钠溶解于 200 毫升水中。

使用时取 I : II 以 4:1 混合。

Nelson 试剂: 25 克钼酸铵[(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O] 溶解

于 450 毫升蒸馏水，加 21 毫升浓硫酸混合。3 克砷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 溶解于 25 毫升蒸馏水中。两者相混，于  $37^\circ\text{C}$  保温 48 小时后使用。

#### 四、操作步骤

##### 1. 以 ONPG 为底物的米氏常数测定

(1) 不同浓度的 ONPG 底物溶液的配制：于 5 支试管中按下表配制。

配制的浓度(mM)	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0
2m M ONPG(毫升)	0.5	1.0	1.5	2	2.5
0.1M pH7 磷酸盐缓冲液(毫升)	2.0	1.5	1.0	0.5	0

(1) 上述五种底物浓度，在酶反应系统中的终浓度分别相当于 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 和 1.0 mM。

(2) 取 16 支试管，编号 1~5，每种浓度重复做三只。各加入不同浓度的底物溶液 0.5 毫升， $65^\circ\text{C}$  预热后，逐管计时加入 0.5 毫升酶液，摇匀，精确反应 15 分钟后，加 1 毫升 1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液，冷却后，以空白管(以水代替酶，其他操作相同)作对照，在 721 型分光光度计于 420 毫微米测定光密度值，以此值作为反应速度。

数据填入下表，并作计算。

用二种作图法(按基本原理中叙述)：

(1) 倒数作图法：  $\frac{1}{[S]}$  为横坐标，  $\frac{1}{v}$  为纵坐标，由直线在横轴上的交点  $-\frac{1}{K_m}$ ，计算得  $K_m$ 。

管 号	1	2	3	4	5
ONPG终浓度[S](mM)	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
$\frac{1}{[S]} \left( \frac{1}{\text{mM}} \right)$					
OD <sub>420</sub> (代表 $v$ )					
$\frac{1}{v}$					

(2) 直接线性作图法: [S] 为横坐标,  $v$  为纵坐标。把每一实验点的两个数值 [S] 和  $v$ , 分别绘制在横轴和纵轴上, 并连成一条直线。五个实验点的五条直线有十个交点, 取第 5 和第 6 点的中值, 相应于横轴上的 [S] 值即为  $K_m$  值。

二种作图法应该得到相似的  $K_m$  值。

## 2. 以棉籽糖为底物的米氏常数测定

(1) 不同浓度棉籽糖底物的配制: 于 5 支试管中按下表配制。

配制的浓度(mM)	20	40	60	80	100
100mM 棉籽糖(毫升)	0.5	1	1.5	2	2.5
pH7 0.1M 磷酸盐缓冲液(毫升)	2	1.5	1	0.5	0

上述五种底物浓度, 在酶反应系统中的终浓度分别相当于 10, 20, 30, 40 和 50 mM。

(2) 取 16 支试管, 编号 1~5, 每种浓度重复做三只。各加入不同浓度的底物溶液 0.5 毫升, 65°C 预热后, 逐管计时加



入 0.5 毫升酶溶液, 精确反应 30 分钟后, 各管加入 1 毫升铜试剂, 摇匀。加完后, 置同一试管架放入沸水浴中加热 10 分钟, 流动水冷却(注意加热和冷却时尽可能少摇动试管), 逐管加入 1 毫升 Nelson 试剂, 立即摇匀, 至没有气泡后, 加适量蒸馏水(使光密度范围在 0.8 以内)。以空白管(以水代替酶, 其他操作相同)作对照, 用 721 型分光光度计于 500 毫微米测定光密度值, 以此值作为反应速度。

数据填入下表, 并作计算。

管 号	1	2	3	4	5
棉籽糖终浓度[S](mM)					
$\frac{1}{[S]}$					
OD <sub>500</sub> (代表v)					
$\frac{1}{v}$					

与 ONPG 为底物的相同方法作图求出  $K_m$  值。

## V. 抑制剂类型的判断及抑制

### 常数 $K_i$ 测定

#### 一、目的

判断出  $\alpha$ -半乳糖苷酶的二种抑制物—— $Ag^+$ 和半乳糖属于可逆还是不可逆抑制; 判断半乳糖的抑制作用是属于竞争性、非竞争性还是反竞争性, 并求出抑制常数  $K_i$ 。

#### 二、原理

抑制剂是能引起催化反应速度降低的一种化合物。酶的

抑制剂有不可逆的，也有可逆的。不可逆抑制剂一经与酶结合就难分开，其抑制不能用透析等物理法解除。可逆抑制剂与酶的结合建立在解离平衡基础上，可以用透析等方法使抑制减轻或消除。

对于不可逆抑制剂，其抑制作用将随着抑制剂浓度的增加而逐渐增加，倘若抑制剂的量足够以使所有的酶予以结合，则将出现完全抑制。对于可逆性抑制剂，其抑制作用也是递增式的，但很快达到一个平衡值，这个数据乃由抑制剂浓度所决定。我们可以通过在固定抑制剂浓度下，以一系列不同浓度的酶进行初速度的测定，从而判断出此抑制剂是属于可逆还是不可逆抑制(见图 35)。

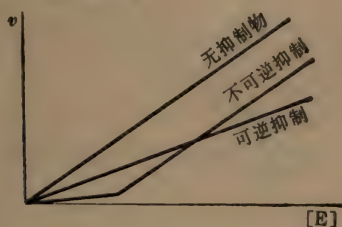


图 35 抑制剂类型图

在可逆抑制剂中，又有竞争性抑制、非竞争性抑制和反竞争性抑制之区别。竞争性抑制剂的效应在于使  $K_m$  的表观值增加， $K_m$  表观值可由抑制物浓度  $[I]$  的增加而增大；竞争性抑制剂的抑制作用只需用足够大的底物浓度就能被抵销，最大速度仍能达到。而非竞争性抑制中，抑制程度和底物浓度之间没有关系，抑制只取决于抑制剂的浓度；非竞争性抑制剂的效应在于降低最大速度而不改变  $K_m$ 。另外，反竞争抑制剂，其效应表现在  $K_m$  和  $V_{max}$  都有了改变。通过  $\frac{1}{[S]} \sim \frac{1}{v}$  作

图可以清楚看出(见图 36)。

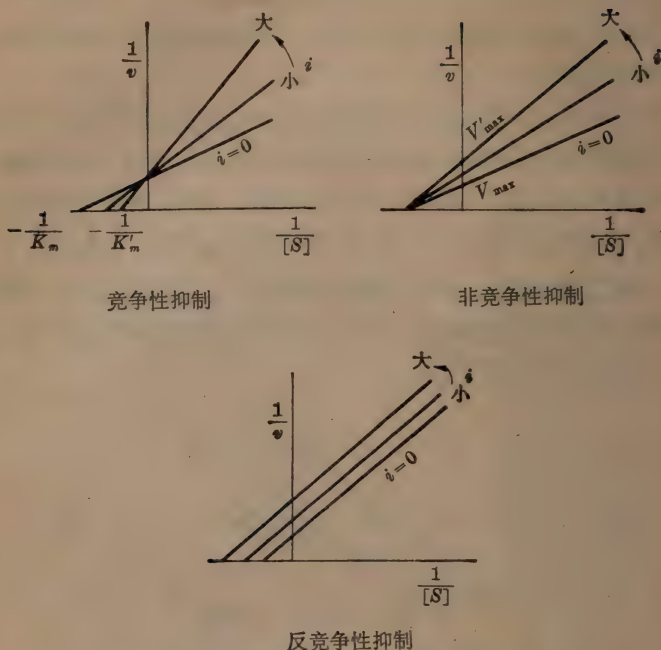


图 36 抑制类型

$K_i$  是抑制剂-酶复合物的解离常数, 可以通过实验计算求得。

对于竞争性抑制剂,  $v_i = \frac{V_{\max} [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]}$ , 所以在具

有抑制剂 I 时, 表观米氏常数  $K'_m = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$ , 由  $\frac{1}{[S]} \sim$

$\frac{1}{v}$  图上得出之  $K_m$  和  $K'_m$ , 及已知值  $[I]$ , 计算出  $K_i$  值。同样,

对于非竞争性抑制剂,  $v_i = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{(K_m + [S]) \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)}$ , 所以在具

有抑制剂时, 表观最大速度  $V'_{\max} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{I}{K_i}}$ , 由  $\frac{1}{[S]} \sim \frac{1}{v}$

图上得出  $V_{\max}$  和  $V'_{\max}$  及已知值  $I$ , 计算出  $K_i$  值。

另外, 也可以通过  $I \sim \frac{1}{v}$  作图求出  $K_i$ , 如图 37。

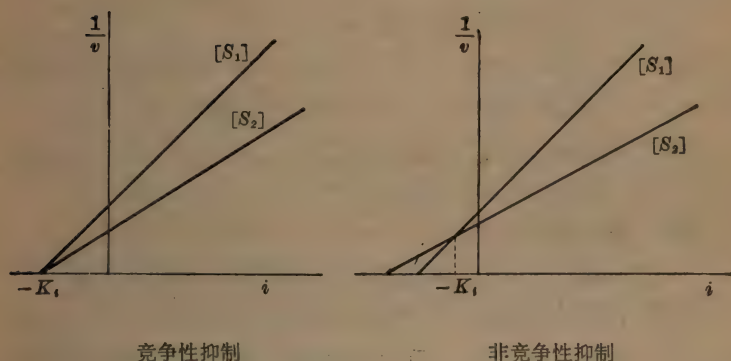


图 37 可逆抑制的类型

本实验要求通过  $[E] \sim v$  图的制作判断出  $Ag^+$  及半乳糖属于可逆还是不可逆抑制剂。通过  $\frac{1}{[S]} \sim \frac{1}{v}$  图的制作判断出半乳糖属于竞争性还是非竞争性抑制, 并求出  $K_i$  值。

### 三、实验材料, 仪器和试剂

#### 1. 实验材料

$\alpha$ -半乳糖苷酶溶液: 同实验 50-I 配制的 10 毫克/毫升的水溶液。测定前用  $0.1M$  pH7 磷酸盐缓冲液再适当稀释



之。

## 2. 仪器

试管  $1.5 \times 15$  厘米( $\times 70$ ); 吸管 0.1 毫升( $\times 3$ ), 0.2 毫升( $\times 1$ ), 0.5 毫升( $\times 6$ ), 1 毫升( $\times 3$ ), 10 毫升( $\times 2$ )。

721 型分光光度计; 电热恒温水浴箱; 时钟; 温度计。

## 3. 试剂

2m M ONPG 溶液: 同实验 50 I 用 pH 7 缓冲液配制。

4m M ONPG 溶液: 24.08 毫克 ONPG, 加 0.1M pH7 磷酸盐缓冲液至 20 毫升。

1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液: 同实验 50 I。

$\text{AgNO}_3$  溶液: 169.87 毫克  $\text{AgNO}_3$  加重蒸水至 10 毫升成 100 m M, 稀释至 0.04 m M (临用时配制)。

半乳糖溶液: 1.8016 克半乳糖加 0.1M pH7 磷酸盐缓冲液至 25 毫升成 0.4M, 再稀释成 0.1, 0.2 和 0.3M。

## 四、操作步骤

### 1. 半乳糖、 $\text{AgNO}_3$ 抑制类型(可逆或不可逆)的判断

在固定的抑制物浓度(半乳糖终浓度为 0.02M,  $\text{AgNO}_3$  终浓度为 0.004 m M), 一系列不同酶浓度下, 进行初速度测定。每种酶浓度重复 2 支, 以下三组同时做。

(1) 半乳糖组: 取试管 13 支编号, 各加酶液 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 和 0.4 毫升, 再于各管分别补加 0.1M pH7 磷酸盐缓冲液使达到 0.4 毫升。

各试管中分别加 0.2M 半乳糖溶液 0.1 毫升。

按次序计时, 分别加入 0.5 毫升 4mM ONPG 液, 精确反应 15 分钟后加 1 毫升 1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 冷却后, 以空白管(以水代酶, 其他操作相同)作对照测出  $\text{OD}_{420}$ 。

(2)  $\text{AgNO}_3$  组: 各步骤与半乳糖组相同, 只要在加半乳

糖处改用加 0.04 毫克分子  $\text{AgNO}_3$  溶液。

(3) 无抑制物组：各步骤与半乳糖组相同，只要在加半乳糖处改用加缓冲液。

将上述三组数据分别填入下表。

管 号		1	2	3	4	5	6
酶毫升数		0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4
OD <sub>420</sub>	无抑制物						
	半乳糖组						
	$\text{AgNO}_3$ 组						

各组分别以酶相对浓度为横坐标，OD<sub>420</sub>为纵坐标作图，根据曲线比较分析所属抑制类型。

2. 半乳糖抑制类型(竞争性、非竞争性或反竞争性)的判断及抑制常数  $K_i$  的测定。

在三种不同浓度半乳糖(终浓度分别为 0, 0.02, 0.04 和 0.06M)的四个组中，分别取不同底物浓度(ONPG 的终浓度分别为 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 及 1mM)进行初速度测定。

取试管 41 支，编号 1~20(每编号重复 2 支，空白 1 支)按下表加入半乳糖、缓冲液及 ONPG 溶液。

然后计时，分别加入酶液 0.3 毫升，65°C 精确反应 15 分钟，加入 1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液 1 毫升，冷却后，于 721 型分光光度计以空白管(以水代替酶，其他操作相同)作对照，测出 OD<sub>420</sub> 值。分别填入下表，并作计算。

管 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
半乳糖	0					0.1M 0.2毫升				
ONPG 2mM(毫升)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
pH7 0.1M 磷酸盐缓冲液(毫升)	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.4	0.3	0.2	0.1	0

管 号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
半乳糖	0.2M 0.2毫升					0.3M 0.2毫升				
ONPG 2mM(毫升)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
pH7 0.1M 磷酸盐缓冲液(毫升)	0.4	0.3	0.2	0.1	0	0.4	0.3	0.2	0.1	0

绘制  $\frac{1}{[S]} \sim \frac{1}{v}$  坐标图, 通过比较分析进而讨论半乳糖所属抑制类型, 并试用作图法及计算法求出  $K_i$ 。按原理部分所述绘制  $[I] \sim \frac{1}{v}$  坐标图, 求出  $K_i$ , 或按公式计算  $K_i$ 。

管 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
半乳糖终浓度	0					0.02M				
ONPG终浓度[S](mM)	0.2	0.4	0.6	0.8	1	0.2	0.4	0.6	0.8	1
$\frac{1}{[S]}$	5	2.5	1.67	1.25	1	5	2.5	1.67	1.25	1
OD <sub>420</sub> (v)										
$\frac{1}{v}$										

(续 表)

管 号	11 12 13 14 15	16 17 18 19 20
半乳糖终浓度	0.04M	0.06M
ONPG终浓度[S](mM)	0.2 0.4 0.6 0.8 1	0.2 0.4 0.6 0.8 1
$\frac{1}{[S]}$	5 2.5 1.67 1.25 1	5 2.5 1.67 1.25 1
OD <sub>420</sub> (v)		
$\frac{1}{v}$		

### 附：α-半乳糖苷酶的制备

选用产 α-半乳糖苷酶的嗜热脂肪芽孢杆菌中通过亚硝基胍多次诱变的菌株 N<sub>2</sub>-3468。用半乳糖诱导培养，菌体悬液保温处理，酶即释放出来，用硫酸铵分级沉淀，制得酶制剂供酶学性质测定。

#### 一、菌体的固体培养

##### 1. 斜面培养基(2只12厘米培养皿)

牛肉膏 0.5%，蛋白胨 1.0%，氯化钠 0.5%，琼脂 2.5%，pH7.5。灭菌 1 公斤，15 分钟。55℃培养 16 小时。

2. α-半乳糖苷酶的诱导培养基(50只12厘米培养皿，配制2000毫升)。

牛肉膏 0.5%，蛋白胨 1.0%，氯化钠 0.5%，D-半乳糖 0.3%，琼脂 2.5%，pH7.5。灭菌 1 公斤，15 分钟。

将斜面培养基上的菌种，加无菌水得悬浊液，滴加在诱导培养基上，涂布均匀。55℃培养 16 小时。

#### 二、酶的浸出

用无菌水刮取诱导培养基上生长的菌体(无菌水的量尽量少些)，将菌体悬浊液于 55℃放置过夜，次日，3000 转/分离心 20~30 分钟。倾



取上清液即为酶的浸出液。

### 三、硫酸铵的分级沉淀

以 0.3~0.55 饱和度硫酸铵分级沉淀。取上述酶抽提液加固体硫酸铵至 0.3 饱和度\*,充分搅拌溶解,冰箱内放置 6 小时以上。3000 转/分离心 20~30 分钟,弃去沉淀物。上清液再加固体硫酸铵至 0.55 饱和度\*,冰箱放置 6 小时以上。3000 转/分离心 20~30 分钟。取沉淀物于 37°C 烘干,磨碎得到  $\alpha$ -半乳糖苷酶制剂。或将沉淀物溶于少量水,透析去盐后冷冻干燥。酶制剂干冻贮存备用。

## 51. 用正交试验设计法测定几种因素 对溶菌酶活性的影响<sup>[37, 38]</sup>

### 一、目的

通过运用正交试验设计法测定 pH、温度和缓冲液浓度对溶菌酶活性的影响,求得溶菌酶的最适温度和最适 pH;初步掌握正交试验设计法的使用。

### 二、原理

(1) 酶的催化作用是在一定条件下进行的,它受多种因素的影响,如底物浓度、酶浓度、pH 值、温度、抑制剂和激活剂等都能影响酶催化的反应速度。通常在其他因素恒定的条件下,通过某因素在一系列变化条件下的酶活性测定求得该因素的影响,这是单因素的试验方法。本实验运用正交试验设计法测定 pH、温度和缓冲液的浓度这三个因素对酶活性的影响,这是多因素的试验方法。

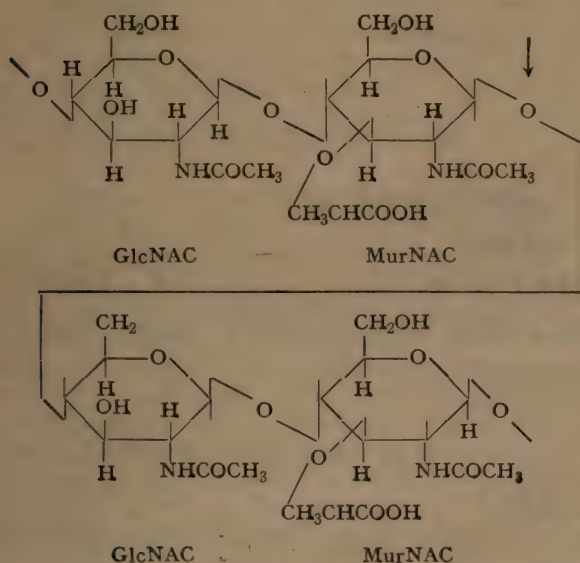
正交试验设计法是通过正交表安排多因子试验,利用统计学原理进行数据分析的一种科学方法。(有关正交试验

---

\* 0.3 硫酸铵饱和度溶液的加入量 280 克/升,增加至 0.55 硫酸铵饱和度应添加量 165 克/升。

设计法的基本思想、适用范围和使用方法等可参阅中国科学院数学研究所统计组编《常用数理统计方法》，34 页，1973，科学出版社；上海市科学技术交流站编，《正交试验设计法》，1975，上海人民出版社。）

(2) 本实验以溶菌酶为测定对象。溶菌酶 E.C.3.2.1.7. 是糖苷水解酶，作用 N-乙酰氨基葡萄糖和 N-乙酰胞壁酸之间的  $\beta$ -1,4 键：

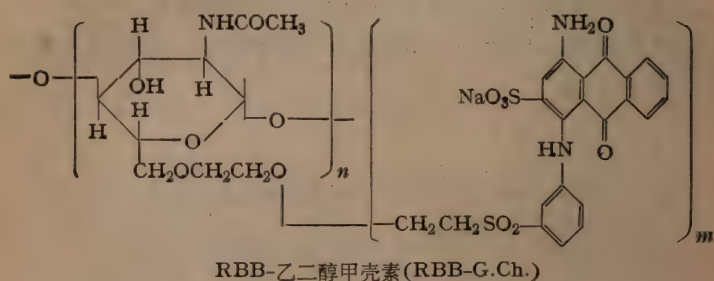


(GlcNAC 表示 N-乙酰-D-氨基葡萄糖；MurAC 表示 N-乙酰胞壁酸)

也可以作用于 N-乙酰氨基葡萄糖之间的  $\beta$ -1,4 键，本实验所用底物甲壳素即是。

酶活性的测定是以活性染料 Remazolbrilliant Blue R 标记的水溶性乙二醇甲壳素(RBB-G.Ch.)为底物进行比色测

定的。由于标记的是非酶作用的位置( $C_6$ 上),故酶催化水解游离出染料标记的水溶性乙二醇甲壳素碎片,在除去未经作用的底物后溶液颜色的深浅就能代表酶的活性大小,此溶液可以直接进行比色测定。



### 三、实验材料,仪器和试剂

#### 1. 实验材料

溶菌酶溶液: 称取 10 毫克溶菌酶粉剂(上海禽蛋二厂,由蛋清制备)定容于 50 毫升蒸馏水中,使成 0.2 毫克/毫升。

滤纸,毛边纸。

#### 2. 仪器

试管  $1.5 \times 15$  厘米( $\times 60$ ); 吸管 1 毫升( $\times 6$ ), 5 毫升( $\times 1$ ), 10 毫升( $\times 2$ )。

72 型分光光度计; 电热恒温水浴箱( $\times 4$ ); 温度计; 秒表。

#### 3. 试剂

2% RBB-乙二醇甲壳素(RBB-G.Ch.)\*溶液: 称取 RBB-乙二醇甲壳素 1 克, 定容于 50 毫升蒸馏水中。

酸乙醇溶液: 98 毫升 95% 乙醇中加 2 毫升浓盐酸。

不同 pH 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液:

0.6M 柠檬酸原液——63 克柠檬酸( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ )加水

至 500 毫升;

0.6M 柠檬酸钠原液——88.2 克柠檬酸钠 ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 加水至 500 毫升。

上述二原液按下表比例混合成不同 pH 缓冲液。

---

\* RBB-乙二醇甲壳素制备:

1. 甲壳素的提制: 将新鲜虾、蟹背壳用水清洗, 除去杂质,  $80^\circ\text{C}$  烘干并粉碎经 40 目过筛。为除去其中大量的碳酸钙, 将壳于 2N HCl (工业用) 中浸渍过夜, 次日用涤纶布抽滤除去酸液, 用新盐酸再浸渍, 如此重复三次, 至无气泡产生, 软化之甲壳用水洗至无酸性, 抽干。然后将此甲壳浸于 10% NaOH (工业用) 中,  $40\sim 50^\circ\text{C}$  浸渍过夜, 次日用丙纶布抽滤除去碱液, 换用新碱再浸渍, 重复四次以去除蛋白质、色素及脂类, 抽干, 水洗至中性,  $80^\circ\text{C}$  烘干, 得无色或微红色甲壳素 (ch.)。

2. 甲壳素的乙二醇化: 5 克甲壳素置于灯泡瓶中, 加入 43% NaOH (W/W) 100 毫升, 搅匀后于  $25^\circ\text{C}$  浸渍, 同时减压使 NaOH 充分渗入, 2 小时后用 2 号砂芯漏斗抽滤除去碱液, 并压榨至约为甲壳素重量的 3 倍 (即 15 克左右)。碱化甲壳素置于研钵中, 在冰盐浴内与 3.5 倍量冰屑混和使迅速分散成高粘度的透明液。用 43% NaOH 调节分散液浓度为 13% (W/W), 再加入 13% NaOH, 使溶液总重量为原甲壳素重量的 20 倍 (即 100 克)。此溶液转移至烧瓶内, 置冰浴中, 加环氧乙烷 5 克, 搅匀后于  $0^\circ\text{C}$  左右放置过夜, 次日再在搅拌下移入  $33^\circ\text{C}$  保温 1.5 小时, 完成乙二醇化后得到淡黄色水铉状乙二醇化甲壳素的透明粘液。用少量蒸馏水将粘液转入烧杯, 在搅拌下加入丙酮乙醇混合液 (丙酮: 90% 乙醇 = 1: 9 V/V) 约 1000 毫升, 使乙二醇化甲壳素沉淀。离心收集沉淀, 以 90% 乙醇洗涤至基本上无碱性后加入少量蒸馏水使之膨润, 再在搅拌下用乙醇沉淀, 离心, 洗涤, 如此反复膨润 3~4 次, 至膨润液 pH 达 8~9, 继而用无水乙醇洗涤沉淀, 最后用乙醚干燥, 得到白色粉末状水溶性乙二醇化甲壳素 (G.ch.)。

3. 乙二醇甲壳素的 RBBR 共价标记: 3 克 G. Ch. 于三颈瓶内, 加蒸馏水 150 毫升, 使完全溶解呈水铉状透明粘液,  $\text{pH} 8\sim 8.5$ ,  $50^\circ\text{C}$  保温, 在搅拌下加入活性染料 RBBR (上海染化八厂产品) 0.6 克/20 毫升水, 然后加 6 克无水硫酸钠 (于 1 小时内分数次加入), 再加 0.3 克三聚磷酸钠 (Sodium Triphosphate), 继续反应 2 小时后取出冷至室温, 搅拌下缓缓加入 90% 乙醇 600 毫升, 使标记的乙二醇化甲壳素 (RBB-G.ch.) 沉淀, 离心收集并用乙醇洗涤以基本除去吸附于沉淀上的未反应的游离染料, 再加入少量蒸馏水使之膨润, 并用乙醇再沉淀, 如此反复 2~3 次至上清液完全无色。用 90%、95%、无水乙醇脱水, 乙醚干燥成深蓝色产品; 或将沉淀悬于少量蒸馏水中, 流动水透析过夜, 最后冷冻干燥。



pH	0.6M 柠檬酸(毫升)	0.6M 柠檬酸钠(毫升)
3.5	38.6	11.4
4.5	27.0	23.0
5.5	14.8	35.2
6.5	4.3	45.7

#### 四、操作步骤

##### 1. 正交表的选择

本实验取三个因子, 即: 温度、pH 和缓冲液浓度。每个因素取四个水平, 见下表。

水平	温度(°C)	pH	缓冲液浓度(M)
1	30	3.5	0.15
2	50	4.5	0.30
3	70	5.5	0.45
4	80	6.5	0.6

按一般方法, 如对三个因子四个水平的各种搭配都要考虑, 共需做  $4^3 = 64$  个试验, 而用正交表  $L_{16}(4^5)$  只需做 16 次试验。

$L_{16}(4^5)$  表有任何正交表都具备的下列特点:

① 任何一列各水平出现的次数相等(这里均为 4)。

$L_{16}(4^5)$  正交表

列号 试验号	1	2	3	4	5
1	1	1	1	1	1
2	1	2	2	2	2
3	1	3	3	3	3
4	1	4	4	4	4
5	2	1	2	3	4
6	2	2	1	4	3
7	2	3	4	1	2
8	2	4	3	2	1
9	3	1	3	4	2
10	3	2	4	3	1
11	3	3	1	2	4
12	3	4	2	1	3
13	4	1	4	2	3
14	4	2	3	1	4
15	4	3	2	4	1
16	4	4	1	3	2

② 任何二列的横行组成的数对出现次数相等 (这里有 16 个数对, 即 1, 1; 1, 2; 1, 3; 1, 4; 2, 1; 2, 2; 2, 3; 2, 4; 3, 1; 3, 2; 3, 3; 3, 4; 4, 1; 4, 2; 4, 3; 4, 4。均出现 1 次)。

③ 任何两行同名数对出现次数相等 (这里有 4 个同名数对, 即 1, 1; 2, 2; 3, 3; 4, 4。均出现一次)。

这些特性保证了用正交表安排的试验计划是均衡搭配的,因此可以进行综合比较和方差分析。

## 2. 试验安排

把本实验三个因子温度、pH 和缓冲液浓度依次放在  $L_{16}(4^5)$  的第 1, 2 和 5 列, 各列的水平数用该列因素相应的水平写出来, 就得到下面的试验安排表。

试验安排表

	1 温度	2 pH	3	4	5 缓冲液 浓度 M	试验结果 $Y_i$ OD <sub>600</sub>
1	1(30°C)	1(3.5)	1	1	1(0.15)	
2	1(30°C)	2(4.5)	2	2	2(0.30)	
3	1(30°C)	3(5.5)	3	3	3(0.45)	
4	1(30°C)	4(6.5)	4	4	4(0.60)	
5	2(50°C)	1(3.5)	2	3	4(0.60)	
6	2(50°C)	2(4.5)	1	4	3(0.45)	
7	2(50°C)	3(5.5)	4	1	2(0.30)	
8	2(50°C)	4(6.5)	3	2	1(0.15)	
9	3(70°C)	1(3.5)	3	4	2(0.30)	
10	3(70°C)	2(4.5)	4	3	1(0.15)	
11	3(70°C)	3(5.5)	1	2	4(0.60)	
12	3(70°C)	4(6.5)	2	1	3(0.45)	
13	4(80°C)	1(3.5)	4	2	3(0.45)	
14	4(80°C)	2(4.5)	3	1	4(0.60)	
15	4(80°C)	3(5.5)	2	4	1(0.15)	
16	4(80°C)	4(6.5)	1	3	2(0.30)	

(续 表)

	1 温度	2 pH	3	4	5 缓冲液 浓度 M	试验结果 $y_i$ OD <sub>600</sub>
$K_1$ (一水平试验结果总和)						$\sum_{i=1}^{16} y_i =$
$K_2$ (二水平试验结果总和)						$CT = \frac{\left(\sum_{i=1}^{16} y_i\right)^2}{16}$
$K_3$ (三水平试验结果总和)						
$K_4$ (四水平试验结果总和)						$=$
$K_1^2$						
$K_2^2$						
$K_3^2$						
$K_4^2$						
$\frac{K_1^2 + K_2^2 + K_3^2 + K_4^2}{4}$						
$S_j = \frac{K_1^2 + K_2^2 + K_3^2 + K_4^2}{4}$						
-CT						

### 3. 具体操作步骤

(1) 将已配制好的四种不同 pH 的 0.6M 缓冲液, 于 16 支试管内按表进一步稀释至一定浓度。

(2) 取试管 16 支, 按试验安排表第 2 列编号分别加入上述不同 pH、不同浓度的缓冲液 0.5 毫升。

(3) 在上述 16 支试管内各加 2% RBB-G.Ch. 溶液 0.5 毫升, 混和之。

(4) 按试验安排表第 1 列编号分别放入相应的 30, 50, 70 和 80°C 恒温水浴箱内预热 5 分钟。



稀释至浓度(M)	0.6M 各组 pH 的缓冲液 (毫升)	水 (毫升)
0.15	2	6
0.30	4	4
0.45	6	2
0.60	8	0

(5) 进行酶反应: 于上述 16 支试管中, 依次每间隔一分钟加溶菌酶溶液 0.5 毫升, 摇匀, 精确反应 30 分钟, 分别加 4 毫升酸乙醇溶液, 摇匀, 简易过滤。

空白组: 于一试管内加 2% RBB-G.Ch. 溶液 0.5 毫升, 水 0.5 毫升, 酸乙醇溶液 4 毫升, 最后加 0.5 毫升溶菌酶溶液, 简易过滤。

(6) 比色: 于 72 型分光光度计 600 毫微米测光密度 ( $OD_{600}$ )。

## 五、数据记录和分析

### 1. 数据记录

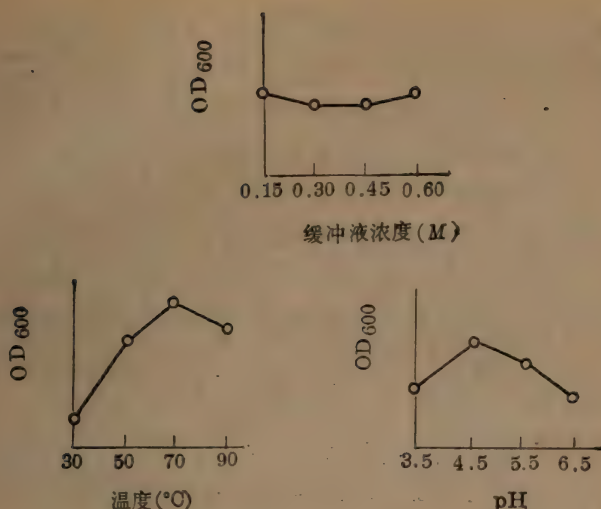
将上述 16 个数据填入试验安排表  $y_i$  项内。

### 2. 数据分析

可直观分析进行综合比较, 也可方差分析。前者方法简单直观, 后者比较精细, 但有一定的计算量。

(1) 直观分析: 在表上计算各水平试验结果总和, 即第 1, 2 和 5 列上的  $K_1, K_2, K_3$  和  $K_4$ , 并分别除以 4。

作用因子和试验数据的关系图, 即把每个因子  $K_1/4, K_2/4, K_3/4, K_4/4$  的  $OD_{600}$  值点在坐标纸上, 按下图制作。



从这些数据和图可以比较,在3个因子中,哪些因子对酶活性影响大,哪些因子影响小;如果某因子对试验数据的影响大,那么它取哪个水平对酶活性最有利。

(2) 方差分析: 方差分析可以给出误差大小的估计。首先按试验安排表所示项目进行表上运算,然后进一步计算下列方差分析表,进行显著性检验。

显著性: 由F分布表查得  $F_{0.05}(3.6) = 4.76$ ,  $F_{0.01}(3.6) = 9.78$ 。如果计算得之某因子  $F_{\text{比}} > F_{0.05}(3.6)$ , 即此因子显著,就在显著性一栏上打\*号,表示有95%的把握说该因子是显著的,如此  $F_{\text{比}} < F_{0.05}(3.6)$ , 则不能说此因子显著;如果某因子  $F_{\text{比}} > F_{0.01}(3.6)$ , 则打\*\*号,表示有99%把握说该因子是显著的。

我们对照直观分析的结果,可以看出直观分析和方差分析的结果是一致的。

方差分析表

方差来源	平方和	自由度	均方	F <sub>比</sub>	显著性
温度	$S_1 =$	3			
pH	$S_2 =$	3			
缓冲液浓度	$S_3 =$	3			
误差	$S_4 + S_5 =$	$3 + 3 = 6$			

说明：平方和取自  $S_j$  项计算之数值；

$$\text{均方} = \frac{\text{平方和}}{\text{自由度}};$$

$$F_{\text{比}} = \frac{\text{因子均方}}{\text{误差均方}}.$$

### 3. 结果讨论

通过上述数据分析讨论温度、pH 及缓冲液浓度在本实验条件下对溶菌酶的酶活性影响如何；温度和 pH 的最适范围如何。

## 52. 酶的超过滤浓缩<sup>[37,39~42]</sup>

### 一、目的

通过各向异性超滤膜的制备和应用，了解超过滤技术的基本原理和方法。

### 二、原理

超过滤是以半透性薄膜为介质，在加压条件下，根据溶液中分子的大小和形态，在埃( $10^{-8}$  厘米)数量级进行选择过滤，从而达到大分子物质分离和浓缩目的的一种技术。

半透性膜在该技术中是个关键。目前已有多种成膜材料和不同的制膜方法。本实验以一般常用的二醋酸纤维素为材

料,采用入水凝冻法制成各向异性膜(指薄膜的正反二面结构不同,又称不对称膜),即将二醋酸纤维素溶解于溶剂(丙酮)和添加剂(甲酰胺)中,过滤,脱除气泡后刮成薄膜,随即浸入冰水中完成成膜过程。这样制成的膜由致密而极薄的“表皮层”(厚度约 0.1~10 微米)和较疏松的海绵状“支持层”(厚度约 100~200 微米)组成。表皮层决定膜的选择性,而支持层则增加机械强度,这种膜通透性好,流量大,物理性能优越。根据制膜液的不同配比和控制成膜条件,可制成各种孔径的膜,以起到不同的“筛分效用”。

超过滤条件温和,没有“相态”变化,而且设备简单,操作方便,因此正日益受到人们重视,应用也越来越广泛。

本实验用该技术浓缩溶菌酶溶液。

### 三、实验材料,仪器和试剂

#### 1. 实验材料

二醋酸纤维素(上海群力塑料厂,批号 75-01-28),结合酸 54.5~56%,粘度 500 厘泊左右。

溶菌酶溶液(1 毫克/毫升):称取溶菌酶制剂(上海禽蛋二厂)100 毫克,溶于自来水 100 毫升中。

滤纸;毛边纸。

#### 2. 仪器

吸管 0.5 毫升( $\times 3$ ), 1 毫升( $\times 1$ ), 5 毫升( $\times 1$ ); 试管 1.5 $\times$ 15 厘米( $\times 17$ ); 量筒 100 毫升( $\times 1$ ); 三角烧瓶 100 毫升( $\times 1$ ); 烧杯 100 毫升( $\times 1$ )。

CS-1 实验型超滤器(上海市轻工业研究所); 72 型分光光度计;电热恒温水浴箱;秒表;水平仪;温度计;玻璃板 12 $\times$ 12 厘米;金属刮刀;细铜丝;搪瓷盘;圆珠笔;剪刀。

#### 3. 试剂



1% RBB-G.Ch. (染料标记的乙二醇甲壳素制备方法见实验 51): 1 克溶于 0.1M pH4.5 醋酸缓冲液 100 毫升。

酸乙醇: 无水乙醇 98 毫升加浓盐酸 2 毫升。

丙酮(化学纯); 甲酰胺(化学纯)。

#### 四、操作步骤

##### 1. 二醋酸纤维素超滤膜的制备

###### (1) 制膜液制备:

100°C左右烘干的二醋酸纤维素 5 克, 丙酮 22.5 毫升, 甲酰胺 10 毫升(三组份比例为 1:4.5:2.0) 于 100 毫升三角烧瓶内, 迅速搅均匀(三角烧瓶应放在冰浴中, 防止丙酮大量挥发), 加塞密闭, 置室温或 30°C左右水浴使纤维素完全溶解。然后用小型超滤器在 3 公斤/厘米<sup>2</sup>压力下, 通过二层粗棉布和一层尼龙布加压过滤, 得到淡黄色清亮粘稠液, 滤液再于上述相同条件静置, 脱除气泡(约二天)后, 即为可用的制膜液。

###### (2) 制膜:

为了得到具有一定性能的超滤膜, 一方面要保持制膜室的恒温恒湿(温度 22~24°C, 湿度 70~80%), 条件简陋的情况下也可在通风柜内进行, 夏季加冰水, 冬季用电炉煮沸水以满足这种要求; 另一方面要严格控制制膜条件。

制膜时, 先将洁净干燥的玻璃板(12×12 厘米)放置水平(需用水平仪校验), 把制膜液倒在玻璃板上端, 用二端绕有细铜丝的金属刮刀由上而下连续、均匀刮成薄膜, 并准确控制蒸发时间为 15 秒(蒸发时间是指刮完膜后到浸入冰水之前在空气中暴露的时间, 此静置过程中, 随溶剂挥发, 膜表面形成一结构紧密的表皮层), 然后立即把带膜的玻璃板全部均匀地浸入盛有 0~4°C冰水的瓷盘内。(冷浸过程中, 膜内溶解的溶剂

和添加剂被漂洗出来,同时醋酸纤维素起胶凝作用,而冷却促进胶凝,以形成多孔的网状结构。)冷浸时间一般为1小时以上。

膜取出前,在正面(刮膜时接触空气的一面)用圆珠笔做记号。膜应放在水中保存,用前需浸泡12小时以上。

## 2. 超过滤

将膜对光观察,选择均匀无孔洞处,按超滤器滤板大小剪成直径为9厘米的圆形膜,装入CS-1实验型超滤器中(注意膜正面朝上!),量取溶菌酶溶液100毫升,从进样口加入,出口处用100毫升烧杯盛接透出液,密闭超滤器,进气口接上氮压缩气钢瓶,通氮气加压,维持 $3.0\sim 3.5$ 公斤/厘米<sup>2</sup>,然后开动振荡器并调节频率和振幅(振荡器的作用是为了减少膜表面浓差极化现象,使透出速度较恒定),室温下进行超过滤浓缩。

从透出液流出开始起,计时20分钟,移开盛接的烧杯,切断氮气,关闭电源开关。浓缩液由进样口倒出,拆开超滤器,取出超滤膜。记录浓缩酶液和透出液体积。

分别对原酶液、浓缩液和透出液进行活力测定。

## 3. 酶活力测定

测定系统为,1%RBB-G.Ch.1毫升,酶液0.5毫升,50°C准确反应15分钟,加酸乙醇4.5毫升停止反应(注意空白管先加酸乙醇,后加酶液),简易过滤,滤液于72型分光光度计600毫微米读取光密度。

## 五、计算

将具体操作条件和数据填入下表,并按要求进行计算。

制膜液组分	二醋酸纤维素	5克
	丙酮	22.5毫升
	甲酰胺	10毫升
制膜条件	温度	°C
	湿度	%
	蒸发时间	秒
	冷浸温度	°C
	冷浸时间	小时
超滤条件	温度	°C
	时间	分
透水速度*		毫升/厘米 <sup>2</sup> ·分
酶液体积	原酶液	毫升
	浓缩液	毫升
	透出液	毫升
	体积浓缩倍数	
酶活力	原酶液(OD <sub>600</sub> )	
	浓缩液(OD <sub>600</sub> )	
	透出液(OD <sub>600</sub> )	
	活力浓缩倍数	
	活力回收(%)	

\*透水速度是指一定压力下,每分钟通过单位面积膜的液体量。一般以毫升/厘米<sup>2</sup>·分表示。实际上在超过滤过程中,由于滤膜的“压密”现象,透水速度随时间而变化,这里采用平均值。

$$\text{体积浓缩倍数} = \frac{\text{原酶液体积(毫升)}}{\text{浓缩液体积(毫升)}}$$

$$\text{活力浓缩倍数} = \frac{\text{浓缩液活力(OD}_{600}\text{/毫升)}}{\text{原酶液活力(OD}_{600}\text{/毫升)}}$$

$$\text{活力回收(\%)} = \frac{\text{浓缩液总活力(OD}_{600}\text{/毫升} \times \text{毫升)}}{\text{原酶液总活力(OD}_{600}\text{/毫升} \times \text{毫升)}}$$

### 53. 固相 5'-磷酸二酯酶的制备<sup>[43~45]</sup>

## 一、目的

通过用重氮法制备固相 5'-磷酸二酯酶，了解固相酶(载体偶联法)制备的基本过程和方法。

## 二、原理

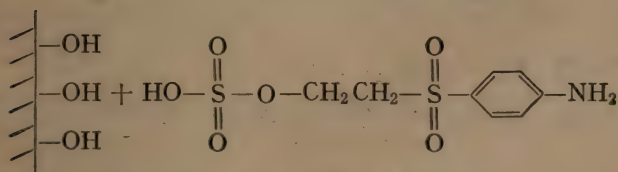
固相酶是近十几年来迅速发展的一项新技术。它是将水溶性酶通过物理或化学方法,使之成为不溶于水而仍具有活性的一种酶衍生物。它的特点是:

- (1) 经固相化后, 可以反复使用, 降低酶的成本;
- (2) 易与产物分离, 便于后处理, 提高产品的质量和产量;

- (3) 有利于生产连续化和自动化等, 从而使酶的实际应用进入一个新的阶段。

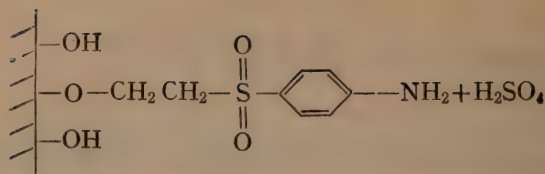
制备固相酶的方法很多, 本实验采用载体偶联法中的重氮法, 将桔青霉(*Penicillium citrium*)发酵生成的 5'-磷酸二酯酶, 借助双功能试剂——对- $\beta$ -硫酸酯乙砒基苯胺(SE-SA)偶联于甘蔗渣纤维素载体上制成固相 5'-磷酸二酯酶。

反应过程如下:

碱化纤维素 对- $\beta$ -硫酸酯乙砜基苯胺(SESA)

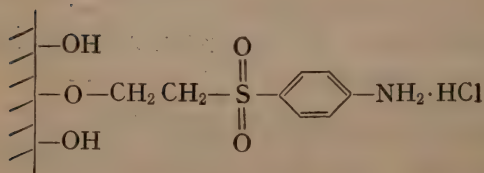
醚化  
pH13, 100°C, 30 分钟



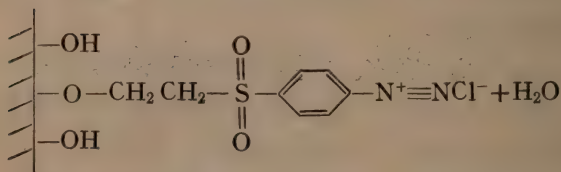


对-氨基苯砒乙醚纤维素 (ABSE 纤维素)

$\downarrow \text{HCl}$

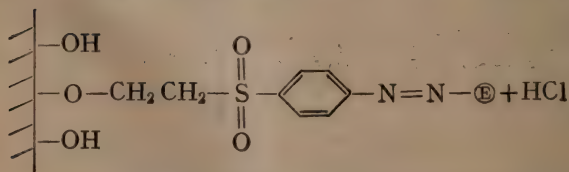


$\downarrow$  重氮化  
HCl, NaNO<sub>2</sub>, 0~5°C, 15 分钟



重氮盐

$\downarrow$  偶联  
5'-磷酸二酯酶, pH7.0~7.5, 0~5°C, 30 分钟



固相酶

### 三、实验材料, 仪器和试剂

#### 1. 实验材料

5'-磷酸二酯酶溶液(10 毫克/毫升)。

纤维素: 甘蔗渣纤维纸板(广东江门甘蔗化工厂)。

广泛试纸 pH1~14; 精密试纸 pH5.6~9.0, pH9.5~13;  
滤纸。

#### 2. 仪器

吸管 10 毫升( $\times 5$ ), 2 毫升( $\times 3$ ), 0.2 毫升( $\times 3$ ), 0.1 毫升( $\times 2$ ); 量筒 50 毫升( $\times 1$ ), 250 毫升( $\times 1$ ); 三角烧瓶 100 毫升( $\times 1$ ); 烧杯 50 毫升( $\times 1$ ), 250 毫升( $\times 1$ ), 500 毫升( $\times 1$ ); 试管 15 $\times$ 150 毫米( $\times 10$ ); 玻璃小漏斗( $\times 1$ ); 2 号砂芯漏斗 100 毫升( $\times 1$ ); 吸滤瓶 50 毫升( $\times 1$ ); 牛奶瓶( $\times 2$ ); 滴管; 玻棒。

电热恒温水浴箱; 水浴锅; 电动搅拌器; 药物台秤; 分析天平; 751 型紫外分光光度计; 秒表; 温度计。

#### 3. 试剂

SESA(染料中间体, 上海染化八厂); 12% NaOH(w/w); 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 0.5N NaOH; 0.05N NaOH; 1N HCl; 0.05N HCl; 5% NaNO<sub>2</sub>; 12% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 3% NaCl。

5'-磷酸二酯酶溶液: 桔青霉经深层发酵去菌体后, 加入预冷至 $-10^{\circ}\text{C}$ 的工业酒精, 使最终浓度达70%, 沉淀的酶糊经吹干得酶粉(活力一般为 15 万单位/克)。称取酶粉 2 克, 加少量蒸馏水研磨溶解, 再定容至 200 毫升, 过滤得棕色透明酶液, 即为 5'-磷酸二酯酶溶液(10 毫克/毫升)。

底物溶液: 称取 RNA (广东江门甘蔗化工厂) 2 克, 加少量蒸馏水调成糊状, 再加适量水, 用 5~6% 氨水调 pH 5.1, 待全部溶解后, 定容至 100 毫升, 配成 2% RNA 溶液。

称取醋酸钠( $\text{NaAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )3.402 克,用蒸馏水定容至 100 毫升;另吸取 99.8% 冰乙酸 1.47 毫升,同样定容至 100 毫升。然后按  $\text{NaAc}:\text{HAc}=7.45:2.55$ (体积比)混合成 0.25M, pH 5.1 醋酸缓冲液,并加入硫酸锌( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )57.5 毫克。上述 2% RNA 100 毫升与醋酸缓冲液 100 毫升混和即成。

高氯酸-钼酸铵试剂:配法见实验 35。

#### 四、操作步骤

##### 1. 纤维素的碱化\*

称取撕碎的甘蔗渣纤维素 3 克,于冰盐浴中加 12%  $\text{NaOH}$  25 毫升,  $0^\circ\text{C}$  搅拌 1 小时。用 375 毫升水稀释后,砂芯漏斗抽滤压干,将此羟基活化的碱化纤维素直接进行醚化。

##### 2. 碱化纤维素的醚化

(1) SESA 的溶解: SESA 3 克,加蒸馏水 6 毫升,于  $40^\circ\text{C}$ ,在搅拌下用 1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  调 pH6.5,溶解后经滤纸过滤至 100 毫升三角瓶中。

(2) 醚化:将碱化纤维素加到上述 SESA 滤液中,室温下用 0.5N  $\text{NaOH}$  调 pH 至 13,再于沸水浴中加热 30 分钟,不断搅拌,继续调 pH 使保持 13。然后用砂芯漏斗抽干,并用 0.05N  $\text{NaOH}$  洗涤 2 次(约 100 毫升/次),蒸馏水洗涤 2 次(约 100 毫升/次)至中性,抽干,尽可能洗除未与纤维素醚化的 SESA。

##### 3. 醚化纤维素的重氮化

将醚化纤维素置于牛奶瓶(或厚质玻璃杯)中,加蒸馏水 20 毫升, 1N  $\text{HCl}$  7.5 毫升,冰浴中搅拌 15 分钟,使生成苯胺盐酸盐,并降温到  $0\sim 5^\circ\text{C}$ ,然后在搅拌下滴加预冷的 5%

---

\* 甘蔗渣纤维素系甘蔗渣-芒秆纤维素。其羟基的活化也可用稀碱法,即将纤维素浸于 0.6%  $\text{NaOH}$  中,  $85^\circ\text{C}$  以上碱化 30 分钟,抽压干后用 SESA 醚化。

$\text{NaNO}_2$  7.5 毫升, 盖好瓶口, 以防亚硝酸( $\text{HNO}_2$ )逸出, 反应 15 分钟, 每 3~5 分钟搅拌 1 次, 反应后迅速于砂芯漏斗中抽干, 并用预冷的 0.05N HCl 洗涤 3 次(约 100 毫升/次), 以除去过剩的  $\text{NaNO}_2$ , 再用预冷的蒸馏水洗涤 1 次, 除去 HCl, 抽干, 立即作酶偶联用。(注意: 由于重氮盐在高温下不稳定, 因此反应于低温进行, 重氮化纤维素的洗涤也要求低温和快速!)

#### 4. 重氮化纤维素与酶的偶联

将重氮化的纤维素加入已盛有预冷至  $0\sim 5^\circ\text{C}$  酶液[含 5'-磷酸二酯酶溶液 7 毫升, 12%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  13 毫升, 蒸馏水 10 毫升]的另一牛奶瓶内, 在冰浴中搅拌反应 30 分钟, 用 1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  维持 pH7.0~7.5, 然后将反应物抽干, 收集滤液(即为偶联反应上清液, 内含未与载体偶联的酶), 固相酶用 3% NaCl 洗涤 3 次(约 100 毫升/次), 以除去吸附于纤维素上的酶, 压干并称重。

分别进行溶液酶和固相酶的活力测定。

#### 5. 酶活力测定

5'-磷酸二酯酶的活力测定通常用紫外光吸收法, 但也可以用定磷法(见实验 39III 中 5'-核苷酸磷的测定), 本实验采用前者。

(1) 溶液酶活力测定: 将偶联反应上清液简易过滤, 除去固相酶残渣后进行测定。于一试管中加入底物溶液(内含 1% RNA, 0.125M pH5.1 醋酸缓冲液, 1mM  $\text{ZnSO}_4$ )1.9 毫升,  $67^\circ\text{C}$  预热 5 分钟, 加酶液 0.1 毫升, 准确反应 15 分钟, 用高氯酸-钼酸铵试剂 2 毫升终止反应, 置冰浴 10 分钟使沉淀完全, 简易过滤后取滤液 0.2 毫升, 加蒸馏水 9.8 毫升, 摇匀, 于 260 毫微米测定光密度值 ( $\text{OD}_{260}$ )。空白先加沉淀剂后加



酶液,其余操作相同。

原酶液稀释(20 倍)后,同样测定。

(2) 固相酶活力测定: 于 50 毫升烧杯中,加入底物溶液 20 毫升, 67°C 预热 5 分钟,加固相酶 0.2000 克左右,准确反应 15 分钟,立即过滤,吸取滤液 2 毫升,用高氯酸-钼酸铵试剂 2 毫升终止反应,置冰浴 10 分钟使沉淀完全,简易过滤后取滤液 0.2 毫升,加蒸馏水 9.8 毫升,摇匀,于 260 毫微米测定光密度值。

(3) 酶活力单位的定义: 在上述条件下,每分钟所形成的核苷酸量在 260 毫微米的光密度为 1.0 时为 1 个单位。

## 6. 计算

$$\text{溶液酶活力(单位/毫升)} = \frac{\text{OD}_{260} \times 2 \times 100 \times \text{稀释倍数}}{0.1 \times 15}$$

$$\text{固相酶活力(单位/克)}^* = \frac{\text{OD}_{260} \times 20 \times 100}{0.2000 \times 15}$$

$$\text{未偶联酶(\%)} = \frac{\text{上清液总活力单位}}{\text{原酶液总活力单位}} \times 100$$

$$\text{酶活力回收(\%)} = \frac{\text{固相酶总活力单位}}{\text{原酶液总活力单位}} \times 100$$

相对活力(\%)

$$= \frac{\text{固相酶总活力单位}}{\text{原酶液总活力单位} - \text{上清液总活力单位}} \times 100$$

---

\* 固相酶活力(单位/克), 应指单位干重的固相酶所具有的活力。本实验按压干后之重量表示。

相对活力表示偶联到载体上的酶所表现的活力百分数。

将测定和计算结果填入表内：

试样	OD <sub>260</sub>	酶活力 (单位/毫升 或单位/克)	总酶量	总活力 单位	未偶联 (%)	活力回收 (%)	相对活力 (%)
液相酶			30毫升				
固相酶			克				

## 七、代 谢

### 54. 发酵过程中无机磷的利用

#### 一、目的

了解发酵过程中无机磷的利用。

#### 二、原理

酵母菌利用葡萄糖进行发酵时，能使无机磷转化为高能有机磷。在发酵实验中可以看到，在开始阶段发酵速度较快，后来速度逐渐缓慢，以至停止。若再加入无机磷，则发酵速度又可恢复。本实验中我们测定发酵前后无机磷含量的变化来证明发酵过程无机磷的消耗。

无机磷含量的测定，可利用它与钼酸根形成磷钼酸复离子，并在适当的还原剂作用下磷钼酸复离子能还原成深蓝色的钼蓝，根据颜色的深浅可比较无机磷的多少。

#### 三、实验材料，仪器和试剂

##### 1. 实验材料

新鲜酵母。

##### 2. 仪器

烧杯 50 毫升( $\times 1$ )；试管  $1.5 \times 15$  厘米( $\times 6$ )；吸管 1 毫升( $\times 4$ )，5 毫升( $\times 1$ )，10 毫升( $\times 1$ )；漏斗 4 厘米( $\times 2$ )；玻棒。

电热恒温水浴箱。

##### 3. 试剂

5% 葡萄糖溶液; 5% 三氯乙酸(TCA); 定磷试剂(见实验 32)。

#### 四、操作步骤

1. 在 50 毫升烧杯中加入 2 克新鲜酵母, 和 1 毫升 5% 葡萄糖溶液, 用玻棒搅拌成均匀糊状, 再加入 9 毫升 5% 葡萄糖溶液并搅拌均匀成葡萄糖酵母悬液。

2. 取试管二支按下表次序加入葡萄糖酵母悬液 1 毫升, 在管 1 中立即加入 TCA 3 毫升。管 2 暂勿加 TCA, 二支试管放入 37°C 水浴箱保温 2 小时。保温后在管 2 中也加入 TCA 3 毫升, 放置 10 分钟使发酵完全中止, 二管分别过滤, 取滤液。

3. 取管 1 和管 2 滤液 1 毫升, 分别放在另二支试管中, 再加入定磷试剂 1 毫升, 在 45°C 水浴中保温 20 分钟, 观察形成钼蓝的深浅, 以此比较无机磷含量的变化, 并解释其结果。

管号	酵母+葡萄糖悬液 (毫升)	5% TCA (毫升)	37 °C 保温 二小时	5% TCA (毫升)	过 滤	滤液 (毫升)	定磷试剂 (毫升)	45 °C 保温 20 分钟	观察 结果
1	1	3		—		1	1		
2	1	—		3	滤	1	1		

### 55. 糖酵解中间产物的鉴定

#### 一、目的

了解糖酵解过程的某一中间步骤及利用抑制剂来研究中间代谢的方法。

#### 二、原理

利用碘乙酸对糖酵解过程中 3-磷酸甘油醛脱氢酶的抑制作用, 使 3-磷酸甘油醛不再向前变化而积累。硫酸肼作为



稳定剂,用来保护 3-磷酸甘油醛使不自发分解。然后用 2,4-二硝基苯肼与 3-磷酸甘油醛在碱性条件下形成 2,4-二硝基苯肼-丙糖的棕色复合物,其棕色程度与 3-磷酸甘油醛含量成正比。

### 三、实验材料,仪器和试剂

#### 1. 实验材料

新鲜酵母。

#### 2. 仪器

发酵管( $\times 3$ );烧杯 50 毫升( $\times 3$ );试管  $1.5 \times 15$  厘米( $\times 3$ );吸管 1 毫升( $\times 5$ ), 2 毫升( $\times 1$ ), 10 毫升( $\times 1$ );小漏斗 5 厘米( $\times 1$ );玻棒。

恒温箱。

#### 3. 试剂

5% 葡萄糖溶液; 10% 三氯乙酸;  $0.75N$  氢氧化钠溶液;  $0.002M$  碘乙酸溶液。

$0.56M$  硫酸肼溶液: 称取 7.28 克硫酸肼溶于 50 毫升水中,这时不易全部溶解,当加入氢氧化钠使 pH 达 7.4 时则完全溶解。此液也可用水合肼溶液配制,可按其克分子浓度稀释至  $0.56M$ ,此时溶液呈碱性,可用浓硫酸调 pH 达 7.4 即可。

2,4-二硝基苯肼溶液: 0.1 克 2,4-二硝基苯肼溶于 100 毫升  $2N$  盐酸溶液中,贮于棕色瓶备用。

### 四、操作步骤

1. 取小烧杯 3 只,分别加入新鲜酵母 0.3 克,并按下表分别加入各试剂,混合均匀。

2. 将各杯混合物分别倒入编号相同的发酵管内,放入  $37^{\circ}C$  保温 1.5 小时,观察发酵管产生气泡的量有何不同。

3. 把发酵管中发酵液倾倒入同号小烧杯中,并在 2 和 3

杯号	5% 葡萄糖 (毫升)	10%三氯醋酸 (毫升)	碘乙酸 (毫升)	硫酸肼 (毫升)	发酵时 气泡多少
1	10	2	1	1	
2	10	—	1	1	
3	10	—	—	—	

号杯中按下表补加各试剂, 摇匀放 10 分钟后和第一只烧杯中内容物一起分别过滤, 取滤液进行测定。

杯号	10%三氯醋酸 (毫升)	碘乙酸 (毫升)	硫酸肼 (毫升)
2	2	—	—
3	2	1	1

4. 取三个试管, 分别加入上述滤液 0.5 毫升, 并按下表加入试剂和处理。

管号	滤液 (毫升)	0.75N NaOH (毫升)	室温放置 10 分钟	2,4-二硝基苯肼 (毫升)	38 °C 水浴保温 10 分钟	0.75N NaOH (毫升)	观察结果
1	0.5	0.5		0.5		3.5	
2	0.5	0.5		0.5		3.5	
3	0.5	0.5		0.5		3.5	

## 五、结果记录和解释

那一管发酵生成的气泡最多? 那一管最后生成的颜色反应最深? 为什么?

## 56. 脱氢酶活性测定

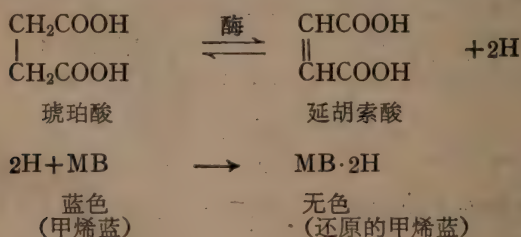
### 一、目的

通过脱氢酶活性测定学习一种研究代谢作用的方法。

### 二、原理

在生物体的物质代谢中,有各种脱氢酶参加,它的作用机制在于促使底物分子上脱去两个氢原子,而使底物氧化,脱下的氢原子又通过细胞内一系列的氧化还原酶系,逐渐传递至氧形成水。如果我们要测定脱氢酶活性,就必须避免由于这一连串酶系所引起的复杂反应,设法使脱下的氢能被人工受体接受,从而直接测定脱氢酶活性。本实验采用染料甲烯蓝(MB)作为人工受体,由酶催化底物脱下的氢,直接为染料接受,使染料本身被还原成无色(MB·2H)。根据甲烯蓝褪色的程度,可以检测脱氢酶的活性。如果要作定量测定,可以用不同浓度甲烯蓝溶液作为比较的标准。

琥珀酸脱氢酶广泛存在于动物、植物和微生物中,它可催化琥珀酸脱氢生成延胡索酸。此反应能被丙二酸抑制。



要使本实验成功,首先要将琥珀酸脱氢酶的供体细胞内原有底物清洗干净。此外由于还原状的甲烯蓝在空气中会被氧化,重现蓝色,因此这个实验要在隔绝空气的容器中进行。

桑氏管便是用来研究脱氢酶的特殊仪器，它是一个具有可盛液体的空心玻璃塞的试管，这个空心塞子和管口是磨口相接的，在试管口上有一支管，可连接在抽气泵上，以便抽去其中的空气(见图 38)。这种特殊式样的试管有二个特点，一是酶和底物可以分别盛在空心塞和试管内，在抽气前可以互不作用，二是有支管可以抽气，使实验在氧气浓度较低的情况下进行，退色的甲烯蓝在短时间内可避免重新氧化。

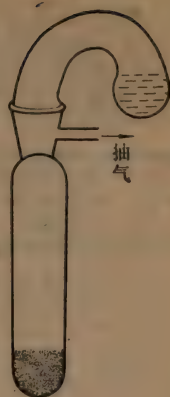


图 38 桑氏管

### 三、实验材料, 仪器和试剂

#### 1. 实验材料

大白鼠肌肉。

#### 2. 仪器

桑氏管( $\times 4$ ); 吸管 1 毫升( $\times 3$ ), 10 毫升( $\times 1$ ); 油泵或水泵; 剪刀。

#### 3. 试剂

$1/15M$  磷酸缓冲液, pH7.0: 11.876 克磷酸氢二钠( $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ ) 溶解在 1 升水中即为  $1/15M$  溶液, 9.078 克磷酸二氢钾( $KH_2PO_4$ ) 溶解在 1 升水中为  $1/15M$  溶液。取  $1/15M Na_2HPO_4$  溶液 60 毫升加  $1/15M KH_2PO_4$  溶液 40 毫升, 即成。

$0.02M$  琥珀酸钠溶液;  $0.02M$  丙二酸钠溶液;  $0.01\%$  甲烯蓝溶液。

### 四、操作步骤

1. 取肌肉 3 克在冰浴中剪碎, 并用冰水洗涤三次, 每次约 20 毫升, 用吸水纸吸干后称量。称取 0.5 克肌肉 4 份, 其



中一份加 5 毫升磷酸缓冲液煮沸。

2. 按下表配制各管, 将酶、缓冲液、甲烯蓝和抑制剂丙二酸溶液放在桑氏管中, 底物琥珀酸放在桑氏管空心塞中。

管号	磷酸缓冲液 pH7.0 (毫升)	肌肉 (毫克)	0.01% 甲烯蓝 (毫升)	0.02M 丙二酸 (毫升)	0.02M 琥珀酸 (毫升)	37 °C 水浴保温	观察现象
1	6	0.5	0.5	—	—		
2	5	0.5	0.5	—	1		
3	5	0.5 (煮沸过)	0.5	—	1		
4	4	0.5	0.5	1	1		

3. 在空心塞小孔两侧, 小心涂上垂直的两条凡士林, 把瓶塞的小孔对准管上的抽气支管, 然后将瓶塞压入稍转动, 使凡士林均匀布满磨口塞的表面, 不使漏气。

4. 将支管连接在水泵中进行抽气, 并轻轻敲击试管, 使气泡容易逸出, 待气泡全部消除即可将空心塞旋转 180°。

5. 待四只管全部抽毕后, 同时放入 37°C 水浴内, 10 分钟后将空心塞中底物倒入管内并混和, 再将桑氏管放回水浴保温, 静置不要振动, 观察各管褪色时间和程度。

## 57. 脂肪酸 $\beta$ -氧化

### 一、目的

了解脂肪酸  $\beta$ -氧化作用机制及学习一种研究代谢作用的方法。

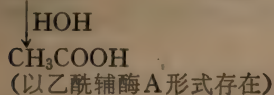
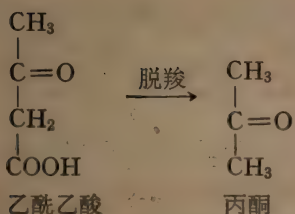
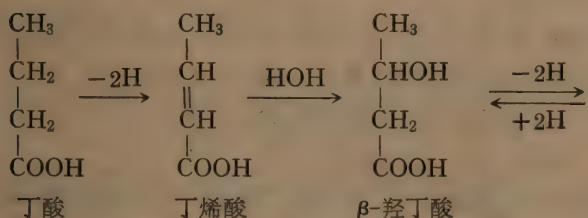
### 二、原理

脂肪酸的分解代谢主要是通过一种  $\beta$ -氧化作用进行的。

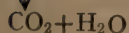
$\beta$ -氧化过程在肝脏中进行，它包括一系列酶反应。首先在长链脂肪酸的  $\beta$  位碳原子上氧化，然后从羧基端断下二碳物，故称为  $\beta$ -氧化作用。断下的二碳物以乙酰辅酶 A 的形式存在，它可以进一步参加三羧酸循环彻底氧化为二氧化碳和水，也可在肝脏内又缩合形成乙酰乙酸。而乙酰乙酸可经脱羧作用形成丙酮。

本实验以丁酸为底物和小白鼠肝脏中脂肪酸氧化酶系一起培养，通过丙酮的形成，来了解  $\beta$ -氧化作用机制。

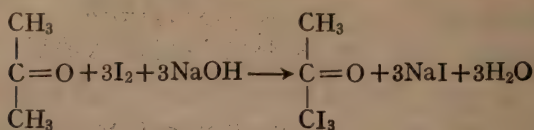
脂肪酸的  $\beta$ -氧化反应：



三羧酸循环



生成的丙酮, 可与碘反应后, 滴定剩余的碘来测定:



### 三、实验材料, 仪器和试剂

#### 1. 实验材料

小白鼠肝脏; 滤纸。

#### 2. 仪器

三角瓶 50 毫升( $\times 5$ ); 吸管 5 毫升( $\times 8$ ), 2 毫升( $\times 1$ );  
微量滴定管 5 毫升( $\times 1$ ); 漏斗 4 厘米( $\times 2$ )。

剪刀; 小台秤; 电热恒温水浴箱。

#### 3. 试剂

0.5N 丁酸溶液: 45 毫升正丁酸用 0.1N 氢氧化钠溶液调 pH 至 7.6, 并稀释至 1 升。

Locke 溶液: NaCl 0.9 克, KCl 0.042 克,  $\text{CaCl}_2$  0.024 克,  $\text{NaHCO}_3$  0.015 克和葡萄糖 0.1 克溶于水中后定容至 100 毫升。

1/15M 磷酸盐缓冲液 pH7.6: 1/15M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  86.8 毫升和 1/15M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  13.2 毫升混合即可。

0.1N 碘溶液: 12.7 克碘和 25 克碘化钾, 用水溶解后, 定容至 1 升。

10% 盐酸: 按 38% 浓盐酸进行稀释。

0.1N 硫代硫酸钠溶液: 结晶硫代硫酸钠 ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 25 克溶解在煮沸并冷却的蒸馏水中, 加入 3.8 克硼砂溶解后定容至 1 升。

15% 三氯乙酸溶液; 10% 氢氧化钠溶液; 0.1% 淀粉溶液。

#### 四、操作步骤

1. 取刚杀死的小白鼠肝脏在冰浴上剪碎, 称取 0.5 克二份。
2. 取 50 毫升三角瓶二只, 按下表配制。

瓶号	Locke (毫升)	磷酸缓冲液 pH7.6 (毫升)	0.5N 丁酸 (毫升)	蒸馏水 (毫升)	肝糜 (克)	37 °C 保温 3 小时	15% 三氯醋酸 (毫升)
1	3	2	3	—	0.5		2
2	3	2	—	3	0.5		2

摇匀后放 37°C 水浴中保温 3 小时, 然后加三氯醋酸停止酶反应。静置 15 分钟后, 分别过滤。

3. 另取三个三角瓶, 分别取上述滤液 5 毫升加入 3 与 4 号瓶, 5 号瓶加水, 并在各瓶中加入 0.1N 碘溶液、10% 氢氧化钠溶液各 5 毫升, 摇匀后静置 10 分钟使碘仿反应完全, 再加 10% HCl 5 毫升, 用 0.1N  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  滴定。

瓶号	滤液 (毫升)	0.1N 碘液 (毫升)	10% NaOH (毫升)	蒸馏水 (毫升)	静置 10 分钟	10% HCl (毫升)	淀粉指示剂 5 滴	0.1N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 滴定 (毫升)
3	5	5	5	—		5		
4	5	5	5	—		5		
5	—	5	5	5		5		

#### 五、计算

1 毫升 0.1N 碘溶液 (或  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  溶液) 相当于 0.9673 毫克丙酮, 故样品中丙酮含量应为:



$$\text{丙酮含量} = \frac{(B-A) \times 0.9673 \times 10}{5}$$

式中：B 为滴定空白管所用硫代硫酸钠溶液毫升数；

A 为滴定样品管所用硫代硫酸钠溶液毫升数。

瓶 3 求得的丙酮量减去瓶 4 (对照) 的丙酮量，即是由丁酸经过  $\beta$ -氧化作用形成的丙酮量。

## 58. 氨基移换反应

### 一、目的

通过本实验学习代谢作用的一种研究方法——定性测定组织中氨基酸移换酶活性的方法。

### 二、原理

氨基移换反应在氨基酸合成和分解代谢中及氨基嘌呤的合成代谢中都十分重要。催化氨基移换反应的酶称为氨基移换酶。这种酶能催化氨基酸上的氨基移换到酮酸上，使酮酸形成相应的氨基酸，而原来的氨基酸却变成酮酸。此反应的最适 pH 是 7.4，需要磷酸吡哆醛或磷酸吡哆胺作为辅酶，在动物组织中氨基移换酶和它所需的辅酶普遍存在。

本实验采用兔肌为材料，将兔肌剪成匀浆后与丙氨酸和  $\alpha$ -酮戊二酸混合，在 37°C 保温，然后取其反应滤液进行纸层析，即可观察到丙氨酸和  $\alpha$ -酮戊二酸在肌肉谷丙转氨酶 (GPT) 作用下转变成谷氨酸和丙酮酸，反应式见下页。

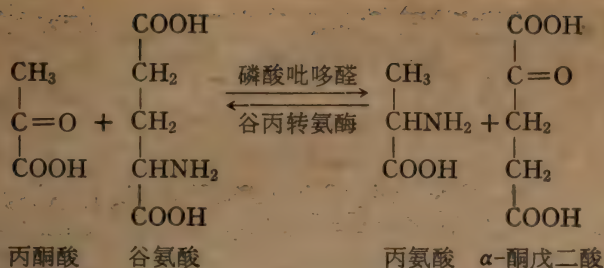
### 三、实验材料，仪器和试剂

#### 1. 实验材料

兔肌；层析滤纸 (15 厘米直径圆形滤纸)。

#### 2. 仪器

吸管 1 毫升 ( $\times 3$ )；试管 1.5  $\times$  15 厘米 ( $\times 8$ )；培养皿 15



厘米( $\times 2$ ); 毛细管。

剪刀; 镊子; 台秤; 电热恒温水浴箱; 水浴锅。

### 3. 试剂

0.01M 磷酸缓冲液, pH7.4: 0.2M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液 81 毫升与 0.2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  溶液 19 毫升混匀, 蒸馏水稀释 20 倍。

0.1M 丙氨酸: 称取 0.891 克丙氨酸以少量 0.01 M, pH 7.4 磷酸缓冲液溶解, 以 NaOH 溶液小心调 pH 到 7.4, 再用磷酸缓冲液定容到 100 毫升。

0.1 M  $\alpha$ -酮戊二酸: 称取 1.461 克  $\alpha$ -酮戊二酸以少量 0.01M pH 7.4 磷酸缓冲液溶解, 以 NaOH 溶液小心调 pH 到 7.4, 再用磷酸缓冲液定容到 100 毫升。

0.1M 谷氨酸: 称取 1.47 克谷氨酸如上法配成 100 毫升溶液。

层析溶剂: 水饱和酚——取新鲜蒸馏无色苯酚二份, 加蒸馏水一份(W/W), 放入分液漏斗中剧烈摇动后静止若干时间, 待二层清楚地分开后, 取下层酚保存于棕色瓶中待用。或正丁醇: 80% 甲醇: 水 = 15: 3: 2 (V/V) 新鲜配制。

0.1% 茚三酮丙酮溶液。

### 四、操作步骤

1. 肌肉糜制备: 将刚杀死的兔子肌肉在低温下剪碎成

管号	0.1 M 丙氨酸 (毫升)	0.1 M $\alpha$ -酮戊 二酸(毫升)	0.01 M pH7.4 磷 酸缓冲液(毫升)	兔肌肉 (克)	
1	1	1	—	1	先保温
2	—	1	1	1	后煮沸
3	1	—	1	1	
4	1	1	—	1	先煮沸, 后保温

糊状备用。

2. 按表次序分别在四支试管中加入上述试剂，其中管4为对照，在37°C保温前先将肌肉在水浴中煮沸10分钟，其余1、2、3管加入肌肉后于37°C保温0.5~1小时，沸水浴加热10分钟终止酶反应。冷却后，简易过滤到4支洁净试管内以作层析用。

3. 取15厘米直径的圆形层析滤纸一张，在圆心处用圆规划一3厘米直径的同心圆，通过中心将滤纸划成六等分扇形，用0.1厘米粗的毛细管分别吸取上述滤液和标准的谷氨酸和丙氨酸溶液分别点在扇形小圆周上，点样直径约0.3厘米，待点样斑点干燥后再重复点样二次。

4. 在滤纸的圆心上剪一小孔直径约1~2毫米，另取一滤纸小条将其下端剪成刷状，卷成“灯芯”插入中心小孔，但不使“灯芯”突出纸面。然后将圆形滤纸平放在盛有层析溶剂的培养皿中，使“灯芯”向下接触溶剂，另一大小相同的培养皿盖在滤纸上（图39）。此时溶剂经过灯芯上升到纸上向四周扩散，直到溶液移动到距纸边1厘米处，打开上盖培养皿，取出滤纸，拔去灯芯，在烘箱中使干燥，然后喷上茚三酮溶液，在60°C烘10~15分钟，滤纸上即可看到紫红色的氨基酸斑点。

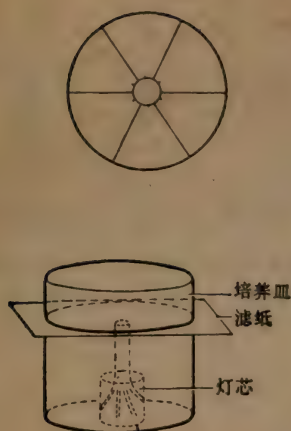


图 39 圆形层析示意图

## 五、实验结果

本实验预期的结果应该是，2号管中因未加丙氨酸，滤纸上不呈现任何斑点。3号管中加入丙氨酸但未加入 $\alpha$ -酮戊二酸，转氨基作用也不进行，滤纸上仅出现加入的丙氨酸斑点。但因组织里可能含有少量游离氨基酸和 $\alpha$ -酮戊二酸，在2号瓶和3号瓶的滤纸上出现很淡的谷氨酸斑点。4号瓶中虽含有丙氨酸和 $\alpha$ -酮戊二酸，但在保温前曾煮沸使酶破坏，因此滤纸上只呈现丙氨酸斑点。1号瓶中含有丙氨酸、 $\alpha$ -酮戊二酸和酶，并有适合的反应条件，因此滤纸上可清楚地看到谷氨酸和丙氨酸斑点。



## 八、附 录

### 1. 市售浓酸和氨水的比重和浓度

名 称	比 重	百分浓度	克分子浓度
盐 酸	1.19	37.2	12.0
盐 酸	1.18	35.2	11.3
硝 酸	1.425	71.0	16.0
硝 酸	1.4	65.6	14.5
硫 酸	1.84	95.3	18.0
高氯酸	1.15	70	11.6
磷 酸	1.69	85	14.7
醋 酸	1.05	99.5	17.4
醋 酸	1.075	80	14.3
氨 水	0.904	27	14.3
氨 水	0.91	25	13.4
氨 水	0.957	10	5.4

### 2. 标准溶液的制备和标定

#### 一、标准氢氧化钠溶液的配制和标定

由于氢氧化钠常不纯和容易吸湿，不能直接配成准确浓度的溶液，因而必须先配成一个近似浓度的溶液，再用标准的酸溶液或酸性盐(如

苯甲酸、酸性邻-苯二甲酸氢钾盐和草酸等)来标定。如要配制 0.1N 氢氧化钠溶液,可先称取分析纯的固体氢氧化钠 4.1 克,用水溶解后转移到 1 升的容量瓶中,冷却后稀释至刻度。溶液保存在橡皮塞的试剂瓶中,待标定。

若用酸性邻-苯二甲酸氢钾( $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ , 分子量 204.22)作为基准物质时,可先准确地(准确到 0.1 毫克)称取分析纯的邻-苯二甲酸氢钾 0.41~0.43 克三份,分别置于 150 毫升三角瓶中,各加入 20 毫升蒸馏水,使全部溶解,加酚酞指示剂 3~4 滴,用待测的氢氧化钠溶液滴定至淡红色出现为止,记下氢氧化钠的滴定体积,通过计算即可知道氢氧化钠的准确浓度:

$$N_{\text{NaOH}} = \frac{W \times 1000}{MV}$$

W 为  $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$  的称量(克);

M 为  $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$  分子量;

V 为 NaOH 滴定体积。

## 二、标准盐酸溶液的配制和标定

标定盐酸通常采用硼砂( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , 分子量 381.43)为基准物质,因硼砂易提纯、不吸水、当量大,标定时准确度高。

硼砂提纯:称取约 30 克分析纯硼砂,溶解在 100 毫升热水中,这时溶液温度为  $55^\circ\text{C}$  以上,待溶液冷却后就析出硼砂结晶,经烧结玻璃漏斗将结晶吸滤出,再用少量水、95%乙醇、无水乙醇和无水乙醚分别依次洗涤,所用乙醇和乙醚的量大约是每 10 克结晶用 5 毫升溶剂。然后结晶平铺成薄层,放室温使乙醚挥发。把纯化的硼砂放在密闭的玻璃瓶中,再贮放在盛有饱和蔗糖和氯化钠溶液的干燥器内,硼砂中的结晶水可保持不变。

如要配制 0.1N 盐酸标准液,可吸取分析纯盐酸(比重 1.19, 约 12N)8.5 毫升,用蒸馏水稀释至 1 升,贮于清洁的试剂瓶中待标定。

准确称取三份干燥的提纯的硼砂 0.381~0.383 克,分别放在 150 毫升三角瓶中,加入 20 毫升蒸馏水,使溶解,加入三滴甲基红指示剂,

用待测的盐酸滴定至橙红色为止,记下盐酸的滴定体积,通过计算即可知道盐酸溶液的准确浓度:

$$N_{\text{HCl}} = \frac{W \times 1000}{M/2 \times V}$$

W 为硼砂称量(克);

V 为 HCl 滴定体积;

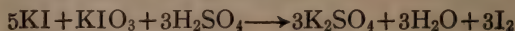
M 为硼砂分子量。

### 三、标准硫代硫酸钠溶液的配制和标定

由于硫代硫酸钠易失去结晶水,其溶液易被硫化菌分解,故对标准溶液要进行标定。硫代硫酸钠( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 分子量 248.19)标准溶液可用重铬酸钾、溴酸钾、碘酸钾等氧化剂来标定。其中常用碘酸钾( $\text{KIO}_3$ , 分子量 214.01), 因它不吸水,较稳定,在酸性条件下具有较强的氧化能力。

如要配制 0.1N 硫代硫酸钠标准液,可称取 25 克分析纯的硫代硫酸钠,溶解在煮沸过的蒸馏水中,并稀释至 1 升,贮存在橡皮塞的试剂瓶中,待标定。

其准确浓度采用  $\text{KIO}_3$  来标定,准确称取 0.1420~0.1500 克纯的碘酸钾三份,分别放在 150 毫升三角瓶中,加入 20 毫升蒸馏水,使溶解,再各加入 10% 碘化钾溶液 10 毫升和 1N 硫酸溶液 20 毫升,混合后用待标定的硫代硫酸钠溶液滴定,当溶液由棕红色变为黄色时,加入 3 滴 1% 淀粉指示剂,继续滴定至蓝色消失为止。记下硫代硫酸钠溶液的滴定体积,并按下式计算其准确浓度。



从反应式中可知碘酸钾中的碘从正 5 价降到负 1 价,其价的变动为 6,所以碘酸钾的克当量为 6。

$$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ 溶液浓度} = \frac{\text{KIO}_3 \text{ 的重量(克)} \times 1000}{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ 滴定体积} \times \frac{214.01}{6}}$$

### 3. 一些层析滤纸的规格与性能

品 名	重量 (克/米 <sup>2</sup> )	厚度 (毫米)	灰分 (%)	性 能
新华滤纸 1 号	90	0.17	0.08	快速, 薄纸
新华滤纸 2 号	90	0.16	0.08	中速, 薄纸
新华滤纸 3 号	90	0.15	0.08	慢速, 薄纸
新华滤纸 4 号	180	0.34	0.08	快速, 厚纸
新华滤纸 5 号	180	0.32	0.08	中速, 厚纸
新华滤纸 6 号	180	0.30	0.08	慢速, 厚纸
SS598G(德)	140~145	0.25~0.28	—	快速, 厚纸
Whatman 1 号	85~95	0.16	0.027	中速, 薄纸
Whatman 2 号	95~100	0.18	—	中速, 薄纸
Whatman 3 号	185	0.36	0.075	中速, 厚纸
Whatman 4 号	90~95	0.91	0.15	快速, 厚纸



#### 4. 各种离子交换树脂

国内产品型号	相 应 国 外		
	英 国		美
华东强酸阳*42	Zerolit 215	Zeo Karb 215 Zeo Karb 315	Amberlite IR-100
华东弱酸阳*122	Zerolit 216	Zeo Karb 216	
弱酸101×1~20或 724(101×4)	Zerolit 226	Zeo Karb 226	Amberlite IRC-50
强酸1×1~24或 732(1×7)	Zerolit 225	Zeo Karb 225	Amberlite IR-120
弱碱320	Zerolit E	De Acidite E	Amberlite IR-48
强碱201或717 (201×7)	Zerolit FF	De Acidite FF	Amberlite IR-400
强碱202×1~24			Amberlite IR-410
弱碱311或704 (311×2)	Zerolit G	De Acidite G	Amberlite IR-45
弱碱301	Zerolit H	De Acidite H	
701(弱碱330)			
脱色树脂1号或 通用1号	Decolorite		
脱色树脂2号			

〔注〕 1. 国产树脂编号: 1~100 为强酸型树脂, 101~200 为弱酸型树脂;

2. 交联度的表示: 如 201×7, 201 为强碱型树脂编号, 7 为交联度; 又编号, 1 到 20 为交联度。

类似商品对照表

树 脂 型 号					树脂类型
国		德 国	日 本	苏 联	
Duolite C <sub>3</sub>	Dowex30	Wofatit KS			磺化酚醛型
Duolite CS-100		Wofatit C			水杨酸酚醛型
		Wofatit CP-300		KB-4	丙烯酸型弱酸
Duolite C <sub>20</sub>	Dowex 50	Wofatit KPS 200	神胶 1 号	KY-2	磺化聚苯乙烯
Duolite A <sub>2</sub>		WofatitM WofatitN		AH-21	酚醛型
	Dowex 1		神胶800	AB-17	苯乙烯型强碱
	Dowex 2		神胶801	AB-18	
Duolite A <sub>30</sub>	Dowex 3			AH-22	苯乙烯型弱碱
				AH-18	
Duolite A 30B		Wofatit L150		ЭДЭ-10П	环氧型弱碱
					多孔弱碱
Duolite S <sub>80</sub>					多孔弱酸

201~300 为强碱型树脂, 301~400 为弱碱型树脂。

如 1×7, 1 为强酸型树脂编号, 7 为交联度; 又如 101×1~20, 101 为弱酸型树脂

# 5. 国产离子交换树脂的物理常数

树脂牌号	类型	功能基	生产单位	外观及大小 (毫米)	含水量 (%)	交换量 (毫克当量/克)	膨胀率	允许温度 (°C)	允许 pH 范围	视密度 (克/毫升)	树脂母体 或原料	国外对照产品
强酸性*1 阳离子交换 树脂	强酸	$-\text{SO}_3\text{H}$	南开大学	淡黄色透明 球状 0.3~1.2	45~55	4.5					苯乙烯, 苯乙烯, 苯, 硫酸	
732 (强 酸性) 1×7	强酸	$-\text{SO}_3\text{H}$	上海树脂 厂	淡黄至褐色 球状 0.3~0.84	46~52	≥4.5					苯乙烯, 苯乙烯, 苯, 硫酸	Amberlite IR-120(美) Zerolit 225(英) KV-2(苏) 神胶1号(日)
华东强酸性 *42 (现已停止 生产)	强酸	$-\text{SO}_3\text{H}$ $-\text{OH}$	华东化工 学院	棕黑色颗粒 0.3~1.0	29~32	2.0~2.2		95(Na型) 40(H型)	1~10		酚醛树脂	Amberlite IR-100(美) Zerolite 215 (英) Dowex-30 (美)
多孔强酸性*1 阳离子交换 树脂	强酸	$-\text{SO}_3\text{H}$	上海树脂 南开大学 上海有机 所	乳白不透明 球状		4.0~4.5					交联聚苯 乙烯	

华东弱酸性*122 阳离子交换树脂 (现已停止生产)	—COOH —OH 弱酸	华东化工学院	透明枣红色颗粒	40~50	3~4				水杨酸, 甲 苯酚, 甲 醛缩聚体	Zerolit 216 (英)
多孔弱酸性*122 阳离子交换树脂	—COOH —OH 弱酸	南开大学	褐黄色不透明球状 0.3~1.0		3.9				水杨酸, 甲 苯酚, 甲 醛缩聚体	
弱酸性*101 阳离子交换树脂	—COOH 弱酸	南开大学	白色透明球状 0.3~1.0		8.5				交联聚甲基 丙烯酸	
724 (弱酸性*101 101×1~8)	—COOH 弱酸	上海树脂厂	乳白色球状 20~50目, 占80%以上	≤65	≥9	$H^+ \rightarrow Na^+$ 150~190%			丙烯酸型	Amberlite IRC-50(美) Zerolit 226(英) KB-4(苏)
强碱性*201 阳离子交换树脂	$-N^+(CH_3)_3Cl^-$ 强碱	南开大学	淡黄色透明球状 0.3~1.0	40~50	2.7				交联聚苯乙烯	Amberlite IRA-410 Dowex-2(美)
711 (强碱性*201 201×4)	$-N^+(CH_3)_3Cl^-$ 强碱	上海树脂厂	淡黄色至金黄色球状, 16~50目, 占90%以上	50~60	≥3.5				交联聚苯乙烯	Amberlite IRA-410 (美) Dowex-2(美)



(续上表)

树脂牌号	类型	功能基	生产单位	外观及大小 (毫米)	含水量 (%)	交换量 (毫克当 量/克)	膨胀率	允许温度 (°C)	允许 pH 范围	视密度 (克/毫 升)	树脂母体 或原料	国外对照产品
717 (强碱) 201×7	强碱	$\text{—N}^+$ $(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$	上海树脂厂	淡黄至金黄色球状, 16 ~50目, 占 95%以上	40~50	$\geq 3$				0.65~ 0.75	交联聚苯 乙烯	Amberlite IRA-400 (美) Zerolit FF (英) 神胶800(日) AB-17(苏)
多孔强碱 *201 阴离子交换 树脂	强碱	$\text{—N}^+$ $(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$	南开大学 上海有机 所实验厂	乳白色球状 0.3~1.0		2.5~3.0					交联聚苯 乙烯	
华东弱碱性 阴离子交换 树脂321 (现已停止 生产)	弱碱	$\text{=NH}$ $\text{—NH}_2$	华东化工 学院	黑色颗粒	37~40	4~6		50	0~7		二乙 苯-多 胺和 烯胺 缩聚 体	Wofatit M (德)
701 (弱碱) 330	弱碱	$\text{—NH}_2$ $\text{=NH}$ $\text{≡N}$	上海树脂厂	琥珀色不规则 球形颗粒 0.2~0.84	55~65	$\geq 9$	$\text{OH}^-$ $\rightarrow \text{Cl}^-$ $\leq 20\%$			0.6~ 0.75	多乙烯多 胺, 环氧 氯丙烷缩 聚体	Duolite A-30B(美) 3月3-10Π (苏) Wofatit L-150(德)

704 (弱碱 311×2)	弱碱	$\begin{array}{c} \text{=NH} \\ \text{—NH}_2 \end{array}$	上海树脂厂	淡黄色球状 0.3~0.84	45~55	$\geq 5$				交联聚苯 乙烯	Amberlite IR 45(美) Zerolit G(英) Dowex-3(美)
301(弱碱阴 离子交换树 脂)	弱碱	$\text{—N(CH}_3)_2$	南开大学	淡黄色球状 0.3~1.0		3.0				交联聚苯 乙烯	
330(弱碱阴 离子交换树 脂)	弱碱	$\begin{array}{c} \text{—NH}_2 \\ \text{=NH} \\ \text{≡N} \end{array}$	南开大学	褐色或金黄 色 0.3~0.84		8.5				多 烯多 胺氯代环 氧丙烷	
301(多孔弱 碱性阴离子 交换树脂)	弱碱	$\text{—N(CH}_3)_2$	南开大学	乳白色球状 0.3~1.0		1.1 (毫克当 量/毫升)				交联聚苯 乙烯	

## 6. 葡聚糖凝胶

型号	筛级	颗粒大小 (微米)	持水量 水(克)/干胶(克)	柱床体积 毫升/干胶(克)	湿密度 (克/厘米 <sup>3</sup> )
G-10		40~120	1.0±0.1	2~3	—
G-15		40~120	1.5±0.2	2.5~3.5	—
G-25					1.13
	粗粒	100~300	2.5±0.2	4~6	
	中粒	50~150	2.5±0.2	4~6	
	细粒	20~80	2.5±0.2	4~6	
	微粒	10~40	2.5±0.2	4~6	
G-50					1.07
	粗粒	100~300	5.0±0.3	9~11	
	中粒	50~150	5.0±0.3	9~11	
	细粒	20~80	5.0±0.3	9~11	
	微粒	10~40	5.0±0.3	9~11	
G-75		40~120	7.5±0.5	12~15	1.05
	微粒	10~40	7.5±0.5	12~15	
G-100		40~120	10.0±1.0	15~20	1.04
	微粒	10~40	10.0±1.0	15~20	
G-150		40~120	15.0±1.5	20~30	—
	微粒	10~40	15.0±1.5	20~30	
G-200		40~120	20.0±2.0	30~40	1.02
	微粒	10~40	20.0±2.0	30~40	

\* 在 100°C 水浴中。

# Sephadex的物理性质

分 组 范 围 (分子量)		吸水膨胀所需时间 (小时)	
肽类和球状蛋白	多 糖	20°C	100°C*
~700	~700	3	1
~1500	~1500	3	1
1,000~5,000	100~5,000		
		(中)6	2
1,500~30,000	500~10,000		
		(中)6	2
3,000~70,000	1,000~50,000		
		24	3
4,000~150,000	1,000~100,000		
		28	5
5,000~400,000	1,000~150,000		
		72	5
5,000~800,000	1,000~200,000		
		72	5



## 7. 常用参考蛋白质的分子量

蛋 白 质 名 称		分子量
中 文	英 文	
肌球蛋白	Myosin	220,000
$\beta$ -半乳糖苷酶	$\beta$ -galactosidase	130,000
副肌球蛋白	Paramyosin	100,000
磷酸化酶 Q	Phosphorylase Q	94,000
血清白蛋白	Serum albumin	68,000
L-氨基酸氧化酶	L-amino acid oxidase	63,000
过氧化氢酶	Catalase	60,000
丙酮酸激活酶	Pyruvate kinase	57,000
谷氨酸脱氢酶	Glutamate dehydrogenase	53,000
亮氨酸氨肽酶	Leucine aminopeptidase	53,000
$\gamma$ -球蛋白, H 链	$\gamma$ -Globulin, H chain	50,000
延胡索酸酶	Fumarase	49,000
卵白蛋白	Ovalbumin	43,000
乙醇脱氢酶(肝)	Alcohol dehydrogenase	41,000
烯醇化酶	Enolase	41,000
醛缩酶	Aldolase	40,000
肌酸激酶	Creatine kinase	40,000
D-氨基酸氧化酶	D-amino acid oxidase	37,000
乙醇脱氢酶(酵母)	Alcohol dehydrogenase(yeast)	37,000
甘油醛磷酸脱氢酶	Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase	36,000

(续上表)

蛋 白 质 名 称		分子量
中 文	英 文	
原肌球蛋白	Tropomyosin	36,000
乳酸脱氢酶	Lactate dehydrogenase	36,000
胃蛋白酶	Pepsin	35,000
天冬氨酸氨甲酰转 移酶C链	Aspartate transcarbamylase C chain	34,000
羧肽酶A	Carboxypeptidase A	34,600
碳酸酐酶	Carbonic anhydrase	29,000
枯草杆菌蛋白酶	Sustilisin	27,600
$\gamma$ -球蛋白, L链	$\gamma$ -globulin, L chain	23,500
胰凝乳蛋白酶原	Chymotrypsinogen	25,700
胰蛋白酶	Trypsin	23,300
木瓜酶(羧甲基)	Papain(Carboxymethyl)	23,000
$\beta$ -乳球蛋白	$\beta$ -Lactoglobulin	18,400
肌红蛋白	Myoglobin	17,200
天冬氨酸氨甲酰转 移酶R链	Aspartate transcarbamylase R chain	17,000
血红蛋白	Hemoglobin	15,500
$Q_{\beta}$ 外壳蛋白	$Q_{\beta}$ Coat protein	15,000
溶菌酶	Lysozyme	14,300
$R_{17}$ 外壳蛋白	$R_{17}$ Coat protein	13,750
核糖核酸酶	Ribonuclease	13,700
细胞色素c	Cytochrome c	11,700
胰凝乳蛋白酶, 2链	Chymotrypsin, 2 chains	11,000和13,000

8. 常用核酸类物质常数表

名称	分子量	熔点 (°C)	溶解度	pH	$\lambda_{\max}$	$\epsilon_{\max} \times 10^{-3}$	$\lambda_{\min}$	$\epsilon_{\min} \times 10^{-3}$	$\epsilon_{260} \times 10^{-3}$	250/260	280/260	290/260	一般性质
腺嘌呤	135.1	360	水中: 25°C, 0.09; 100°C, 2.5 溶于酸碱, 微 溶于乙醇, 不 溶于乙醚、氯 仿	1~3  6~8  0.01N NaOH	262.5	13.15	229	2.55	13.0	0.76	0.375	0.035	用HNO <sub>2</sub> 脱氮成 次黄嘌呤, 稀酸 水解DNA而释 放出
					260.5	13.35	226	2.55	13.3	0.76	0.125	0.005	
					269	12.3	237	3.35	10.45	0.57	0.60	0.025	
鸟嘌呤	151.1	360	溶于酸碱, 极 微溶于乙醇, 不溶于水及有 机酸	1~2  7  11  1N NaOH	275.5	7.35	267	7.15	8.0	1.37	0.84	0.49	用HNO <sub>2</sub> 脱氮成 多黄嘌呤, 与许多 酸碱形成结晶 盐, 盐酸化合物 含一份水。在pH 1与11紫外灯下 有明显蓝荧光, 在pH7时这种荧 光极少
					248.5	11.4							
					275.5	8.15	262	7.05	7.2	1.42	1.04	0.54	
					246	10.7							
					273.5	8.0	255	6.05	6.4	0.985	1.134	0.585	
					246	6.3							
					274	9.9	240	5.15	7.3	0.805	1.24	0.605	

胞嘧啶	111.1	320~ 325	水中: 25°C, 1~3 0.77 微溶于乙醇, 不溶于乙醚	276 210 267 282	10.0 9.7 6.13 7.86	238 247 250	6.0	0.48	1.53	0.78	100°C 失去结晶 水。溶于次氯酸 钠中产生红色并 使NH <sub>4</sub> OH的滴 定数增加
胸腺嘧啶	126.1	318~ 321	水中: 25°C, 1~7 0.404 溶于热水, 微 溶于乙醇, 极 微溶于乙醚	264.5 207 291	7.89 9.5 5.44	233 244	1.9 2.2	0.67 0.65	0.53 1.31	0.09 1.41	
尿嘧啶	112.1	335	水中: 25°C, 2~7 0.36 溶于碱, 极微 溶于乙醇, 不 溶于乙醚	259.5 284 260	8.20 6.15 7.80	227 241 229	1.8 2.1 1.5	0.84 0.71 0.795	0.175 1.40 0.30	0.01 1.27 0.05	
次黄嘌呤	136.1	150	水中: 19°C, 4~7 0.07; 100°C, 1.4 溶于稀酸碱	249.5 258.5 248	10.7 11.05 10.8	221 232 215	2.55 3.75 1.7	1.32 0.84 1.45	0.092 0.124 0.04	0.010 0.007 0.000	用1N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 或 10N NaOH 处 理1小时, 被破 坏量少于5%
				262.5	11.45	233	3.5	0.705	0.19	0.007	



(续上表)

名称	分子量	熔点 (°C)	溶解度	pH	$\lambda_{\max}$	$\epsilon_{\max} \times 10^{-3}$	$\lambda_{\min}$	$\epsilon_{\min} \times 10^{-3}$	$\epsilon_{260} \times 10^{-3}$	250/260	280/260	290/260	一般性质
黄嘌呤	152.1		水中: 20°C, 0.05; 100°C, 0.2 溶于碱, 微溶于乙醇, 不溶于有机溶剂	2~6 10  6N HCl  1N NaOH	267	10.25	240	2.7	8.85	0.565	0.61	0.07	用1N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 或10N NaOH处理1小时后, 被破坏的少于10%
					277.5	9.3	257	5.0	5.2	1.29	1.71	0.92	
					240.5	8.9							
					260	9.15	242	5.2	9.15	0.765	0.15	0.005	
乳酸	156.1	345	水中: 18°C, 0.18	1~2  4~7.2 207	230.5	6.35							
					284	9.4	257	3.6	3.75	1.11	2.39	2.27	
					205	10.9	240	0.9	4.2	0.55	1.80	1.55	
					280	7.52							
乳酸				12~13	278.5	7.68			4.5	0.57	1.71	1.38	
					286	5.98	243	3.4	3.35	0.79	1.73	1.73	
					289	5.35			2.4	0.81	2.00	2.23	

腺苷	267.2	234~ 235	溶于水, 极微 溶于乙醇	1~2 7~12	257	14.6	230	3.5	14.3	0.84	0.215	0.03 0.002	在真空中 100°C 失去结晶水, 在 稀无机酸中迅速 被水解成 A 与 D- 核糖, 被 HNO <sub>2</sub> 脱氮成肌苷
鸟苷	283.2	240	水中: 18°C, 0.08; 100°C, 3.0 溶于稀无机 酸、碱、热冰 酸, 不溶于乙 醚、乙醇、氯仿 苯	1 7 11	256.5 252.5 253~ 266	12.2 13.65 11.3	238 223 231	2.4 2.8 4.1	11.75 11.7 11.3	0.94 1.15 0.89	0.695 0.67 0.61	0.50 0.275 0.13	在稀无机酸中易 水解成鸟嘌呤和 D-核糖, 在 pH1 时紫外灯下有蓝 荧光, 碱性时无 荧光, 用 HNO <sub>2</sub> 脱氮成黄嘌呤核 苷
胞苷	243.2	212~ 215	溶于水, 微溶 于乙醇	1~2 7~12	280 271	13.4 9.1	241 250		6.4 7.55	0.45 0.86	2.10 0.94	1.58 0.34	将胞苷用 HNO <sub>2</sub> 脱氮制取
尿苷	244.2	163.5 ~166	溶于水, 微溶 于乙醇	1~7 11~12	262 262	10.1 7.45	231 237	2.0 4.5	9.95 7.35	0.74 0.83	0.35 0.29	0.03 0.02	将胞苷用 HNO <sub>2</sub> 脱氮制取
肌苷	268.2	213	水中: 20°C, 1.6 极微溶于乙醇 2N HCl	3~6 11.2	248.5 251 253	12.25 10.9 13.1	223 224	3.4 2.5	7.1 9.0 11.7	1.68 1.21 1.05	0.25 0.11 0.18	0.025 0.000 0.008	在稀无机酸中易 水解成黄嘌呤和 D-核糖

(续上表)

名称	分子量	熔点 (°C)	溶解度	pH	$\lambda_{\max}$	$\epsilon_{\max} \times 10^{-3}$	$\lambda_{\min}$	$\epsilon_{\min} \times 10^{-3}$	$E_{260} \times 10^{-3}$	250/260	280/260	290/260	一般性质
黄苷	284.2			2	263	8.95	248	6.4	8.7	0.75	0.28	0.03	
					235	8.4	217	3.9					
				7	277								
					248				7.9	1.29	1.10	0.58	
乳清酸核苷	288.2	大于 400	溶于水、乙醇	8~11	278	8.9	264	7.0	7.65	1.30	1.13	0.61	易被稀无机酸水解
					248.5	10.2	222	2.8					
				2	267	9.57	234	2.6		0.65	0.79		
				12	267	7.6	245	5.7		0.82	0.72		
脱氧腺苷	251.2	186~ 189	溶于水	2	258	14.1				0.83	0.24		易被稀酸水解， 其氢氧化物真空 80°C失去结晶水
脱氧鸟苷	267.2	300~1	溶于水	1	255	12.1			11.3	1.02	0.70		易被稀无机酸水解
				7			230	2.2	11.75	0.99	0.61		

脱氧胞苷	227.2	199~201	溶于水	1~2	280	13.2	241		6.15	0.42	2.14	1.61	
				7~12	271	9.0	250		7.35	0.83	0.965	0.305	
脱氧胸腺苷	242.2	186~7		1~7	267	9.65	235		8.75	0.65	0.72	0.235	
				12~13	267	7.38	240		6.65	0.75	0.67	0.16	
脱氧尿苷	228.2	167	溶于甲醇、水	1~7	262	10.2	231	2.2	10.1	0.72	0.375		
				11~12	262	7.63	242	5.3	7.55	0.81	0.31		
5'-AMP	347.2	196~200	溶于热水	2	257	15.0	230	3.5	14.5	0.84	0.22	0.038	用20% HCl回流时仅产生少量糠醛
				7~12	259	15.3	227	2.6	15.3	0.79	0.15	0.009	
5'-GMP	363.2	190~200		1	256	12.2			11.6	0.96	0.67		
				7	252	13.7			11.7	11.6	0.66		
				11	258	11.6			11.5	0.90	0.61		
5'-CMP	323.2	233		1~2.5	280	13.2	241		6.3	0.45	2.10	1.55	
				6~12	271	9.1	250		7.4	0.84	0.99	0.33	



(续上表)

名称	分子量	熔点 (°C)	溶解度	pH	$\lambda_{\max}$	$\epsilon_{\max} \times 10^{-3}$	$\lambda_{\min}$	$\epsilon_{\min} \times 10^{-3}$	$\epsilon_{260} \times 10^{-3}$	250/260	280/260	290/260	一般性质
5'-UMP	324.2	198.5		2~7	262	10.0			9.9	0.73	0.39	0.03	
				11	261	7.8			7.7	0.83	0.31	0.02	
				12					7.3	0.82	0.33	0.02	
5'-ATP	507.2			2	257	14.7	230	3.5	14.3	0.85	0.22	0.027	用1N HCl 100°C处理10分钟, 86%磷酸酯以无机磷形式被释放, 出, 中性的钠盐或钾盐在-15°C溶液状态稳定几个月, 在0°C约稳定一周。0°C. 处于7%三氯醋酸条件下只稳定几个小时, 在碱性溶液中0°C也被分解成无机焦磷酸酯和5'-AMP
				7~11	259	15.4	227	2.5	15.4	0.80	0.15	0.003	
5'-IMP	348.2		溶于水、甲酸、乙醇、乙醚	2	249	11.7			7.5	1.59	0.22		用稀酸水解成黄嘌呤, 核糖-5-磷酸、D-核糖、无机磷
				7	248	12.3				1.63	0.23		
				11	254	12.3	223		11.4	1.09	0.20		

5"-dAMP	331.2		2	253	14.8			14.5	0.82	0.23	0.007	单钙盐含二份结晶水, 白色无定形固体, 易被稀无机酸水解
			7~12					15.3	0.80	0.14		
5"-dGMP	347.2		2					11.7	1.03	0.70	0.46	单钡盐含4份水, 易被稀无机酸水解
			4.3~7					12.8	1.13	0.67	0.27	
5"-dCMP	307.2	183~184	1~2.5	280	13.2	241		6.3	0.46	2.12	1.55	
			6~12			250		7.4	0.82	0.99	0.30	
5"-dTMP	322.2	175	1~7	267	9.9			9.0	0.65	0.72	0.23	
			12	207	9.5			6.9	0.74	0.67	0.17	

## 9. 酸碱指示剂

指示剂名称		颜色		pH范围	配制方法
中文	英文	酸	碱		
麝香草酚蓝	Thymol blue	红	黄	1.2~2.8	0.1克溶于250毫升的下列溶剂
甲基黄	Methyl yellow	红	黄	3.0~4.0	90%乙醇
间甲酚紫 (酸范围)	m-cresol purple	红	黄	1.2~2.8	水, 含2.62毫升 0.1N NaOH
溴酚蓝	Bromophenol blue	黄	蓝紫	3.0~4.6	水, 含1.49毫升 0.1N NaOH
甲基橙	Methyl orange	红	橙黄	3.1~4.4	水, 含3毫升0.1 N NaOH
溴甲酚绿	Bromocresol green	黄	蓝	3.8~5.4	水, 含1.45毫升 0.1N NaOH
刚果红	Congo red	红紫	红橙	3.0~5.0	水或80%乙醇中
甲基红	Methyl red	红	黄	4.2~6.2	60%乙醇中
氯酚红	Chlorophenol red	黄	紫红	4.8~6.4	水, 含2.36毫升 0.1N NaOH
石蕊	Litmus	红	蓝	5.0~8.0	水 (或每升水中 5~10克)
溴甲酚紫	Bromocresol purple	黄	红紫	5.2~6.8	水, 含1.85毫升 0.1N NaOH (或每升 20% 乙 醇中 1 克)
溴麝香草酚蓝	Bromothymol blue	黄	蓝	6.0~7.6	水, 含 1.6 毫升 0.1N NaOH
酚红	Phenol red	黄	红	6.8~8.4	水, 含2.82毫升 0.1N NaOH
中性红	Neutral red	黄	琥珀 黄	6.8~8.0	70%乙醇中

(续上表)

指示剂名称		颜色		pH范围	配制方法
中 文	英 文	酸	碱		0.1克溶于250毫升的下列溶剂
甲酚红	Cresol red	黄	紫红	7.2~8.8	水, 含2.62毫升0.1N NaOH
间甲酚紫	m-cresol purple	黄	紫	7.4~9.0	水, 含2.62毫升0.1N NaOH
$\alpha$ -萘酚酞	$\alpha$ -naphtholphthalein	橙红	蓝绿	7.0~8.7	50%乙醇中
麝香草酚蓝	Thymol blue	黄	蓝	8.0~9.6	水, 含2.15毫升0.1N NaOH
酚酞	Phenolphthalein	无色	粉红	8.3~10.0	70%乙醇
麝香草酚酞	Thymolphthalein	无色	蓝	9.4~10.6	90%乙醇
茜素	Alizarin yellow	黄	红	10.0~12.0	乙醇

## 10. 缓冲液配制方法

广范围的缓冲液(pH2.6~12.0)

pH (18°C)	混合液* (毫升)	0.2N NaOH (毫升)	pH (18°C)	混合液 (毫升)	0.2N NaOH (毫升)
2.6	100	2.0	4.2	100	17.6
2.8	100	4.3	4.4	100	19.9
3.0	100	6.4	4.6	100	22.4
3.2	100	8.3	4.8	100	24.8
3.4	100	10.1	5.0	100	27.1
3.6	100	11.8	5.2	100	29.5
3.8	100	13.7	5.4	100	31.8
4.0	100	15.5	5.6	100	34.2



(续上表)

pH (18°C)	混合液 (毫升)	0.2N NaOH (毫升)	pH (18°C)	混合液 (毫升)	0.2N NaOH (毫升)
5.8	100	36.5	9.0	100	72.7
6.0	100	38.9	9.2	100	74.0
6.2	100	41.2	9.4	100	75.9
6.4	100	43.5	9.6	100	77.6
6.6	100	46.0	9.8	100	79.3
6.8	100	48.3	10.0	100	80.8
7.0	100	50.6	10.2	100	82.0
7.2	100	52.9	10.4	100	82.9
7.4	100	55.8	10.6	100	83.9
7.6	100	58.6	10.8	100	84.9
7.8	100	61.7	11.0	100	86.0
8.0	100	63.7	11.2	100	87.7
8.2	100	65.6	11.4	100	89.7
8.4	100	67.5	11.6	100	92.0
8.6	100	69.3	11.8	100	95.0
8.8	100	71.0	12.0	100	99.6

\* 混合液配制: 6.008 克柠檬酸, 3.893 克磷酸二氢钾, 1.769 克硼酸和 5.266 克巴比妥酸混和于 1000 毫升水中。(上述四种成份在混合液中的浓度均为 0.02857M<sub>0</sub>)

氯化钾-盐酸缓冲液(pH 1~2.20)

pH	0.2M KCl (毫升)	0.2M HCl (毫升)	水 (毫升)	pH	0.2M KCl (毫升)	0.2M HCl (毫升)	水 (毫升)
1.0	25	67.0	8.0	1.7	25	13.0	62.0
1.1	25	52.8	22.2	1.8	25	10.2	64.8
1.2	25	42.5	32.5	1.9	25	8.1	66.9
1.3	25	33.6	42.9	2.0	25	6.5	68.5
1.4	25	26.6	48.4	2.1	25	5.1	69.9
1.5	25	20.7	54.3	2.2	25	3.9	71.1
1.6	25	16.2	58.8				

0.2M 氯化钾(KCl)溶液每升含氯化钾 14.919 克。

甘氨酸-盐酸缓冲液(pH 2.2~3.6)

pH (25°C)	0.2M 甘氨酸 (毫升)	0.2N HCl (毫升)	水 (毫升)
2.2	25	22.0	53.0
2.4	25	16.2	58.8
2.6	25	12.1	62.9
2.8	25	8.4	68.6
3.0	25	5.7	69.3
3.2	25	4.1	70.9
3.4	25	3.2	71.8
3.6	25	2.5	72.5

甘氨酸分子量=75.07, 0.2M甘氨酸溶液每升含甘氨酸 15.01 克/升。

邻苯二甲酸-盐酸缓冲液(pH2.2~4.0)

pH (25°C)	0.1M KH-邻苯二甲酸 (毫升)	0.1N HCl (毫升)	水 (毫升)
2.2	50	49.5	0.5
2.3	50	45.8	4.2
2.4	50	42.2	7.8
2.5	50	38.8	11.2
2.6	50	35.4	14.6
2.7	50	32.1	17.9
2.8	50	28.9	21.1
2.9	50	25.7	24.3
3.0	50	22.3	27.7
3.1	50	18.8	31.2
3.2	50	15.7	34.3
3.3	50	12.9	37.1
3.4	50	10.4	39.6
3.5	50	8.2	41.8
3.6	50	6.3	43.7
3.7	50	4.5	45.5
3.8	50	2.9	47.1
3.9	50	1.4	48.6
4.0	50	0.1	49.9

KH-邻苯二甲酸分子量=204.23,

0.1M KH-邻苯二甲酸溶液含 20.42 克/升。

邻苯二甲酸-氢氧化钠缓冲液(pH4.1~5.9)

pH (25°C)	0.1M KH-邻苯二甲酸 (毫升)	0.1N NaOH (毫升)	水 (毫升)
4.1	50	1.3	48.7
4.2	50	3.0	47.0
4.3	50	4.7	45.3
4.4	50	6.6	43.4
4.5	50	8.7	41.3
4.6	50	11.1	38.9
4.7	50	13.6	36.4
4.8	50	16.5	33.5
4.9	50	19.4	30.6
5.0	50	22.6	27.4
5.1	50	25.5	24.5
5.2	50	28.8	21.2
5.3	50	31.6	18.4
5.4	50	34.1	15.9
5.5	50	36.6	13.4
5.6	50	38.8	11.2
5.7	50	40.6	9.4
5.8	50	42.3	7.7
5.9	50	43.7	6.3

KH-邻苯二甲酸分子量=204.23。

0.1M KH-邻苯二甲酸溶液含~0.42克/升。



磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(pH2.2~8.0)

pH	0.2M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (毫升)	0.1M 柠檬酸 (毫升)	pH	0.2M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (毫升)	0.1M 柠檬酸 (毫升)
2.2	2.00	98.00	5.2	53.60	46.40
2.4	6.20	93.80	5.4	55.75	44.25
2.6	10.90	89.10	5.6	58.00	42.00
2.8	15.85	84.15	5.8	60.45	39.55
3.0	20.55	79.45	6.0	63.15	36.85
3.2	24.70	75.30	6.2	66.10	33.90
3.4	28.50	71.50	6.4	69.25	30.75
3.6	32.20	67.80	6.6	72.75	27.25
3.8	35.50	64.50	6.8	77.25	22.75
4.0	38.55	61.45	7.0	82.35	17.65
4.2	41.40	58.60	7.2	86.95	13.05
4.4	44.10	55.90	7.4	90.85	9.15
4.6	46.75	53.25	7.6	93.65	6.35
4.8	49.30	50.70	7.8	95.75	4.25
5.0	51.50	48.50	8.0	97.25	2.75

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 分子量=178.05, 0.2M 溶液含 35.61 克/升。

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 分子量=141.98, 0.2M 溶液含 28.40 克/升。

柠檬酸·H<sub>2</sub>O 分子量=210.14, 0.1M 溶液含 21.01 克/升。

柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH3.0~6.2)

pH	0.1M 柠檬酸 (毫升)	0.1M 柠檬酸三钠 (毫升)	pH	0.1M 柠檬酸 (毫升)	0.1M 柠檬酸三钠 (毫升)
3.0	82.0	18.0	4.8	40.0	60.0
3.2	77.5	22.5	5.0	35.0	65.0
3.4	73.0	27.0	5.2	30.5	69.5
3.6	68.5	31.5	5.4	25.5	74.5
3.8	63.5	36.5	5.6	21.0	79.0
4.0	59.0	41.0	5.8	16.0	84.0
4.2	54.0	46.0	6.0	11.5	88.5
4.4	49.5	50.5	6.2	8.0	92.0
4.6	44.5	55.5			

柠檬酸·H<sub>2</sub>O 分子量=210.14, 0.1M 溶液含 21.01 克/升。

Na<sub>3</sub>-柠檬酸·2H<sub>2</sub>O 分子量=294.12, 0.1M 溶液含 29.4 克/升。

醋酸缓冲液(pH3.6~5.8)

pH (18°C)	0.2M NaAc (毫升)	0.2M HAc (毫升)	pH (18°C)	0.2M NaAc (毫升)	0.2M HAc (毫升)
3.6	7.5	92.5	4.8	5.90	41.0
3.8	12.0	88.0	5.0	70.0	30.0
4.0	18.0	82.0	5.2	79.0	21.0
4.2	26.5	73.5	5.4	86.0	14.0
4.4	37.0	63.0	5.6	91.0	9.0
4.6	49.0	51.0	5.8	94.0	6.0

NaAc·3H<sub>2</sub>O 分子量=136.09, 0.2M 溶液含 27.22 克/升。

二甲基戊二酸-氢氧化钠缓冲液 (pH3.2~7.6)

pH (21°C)	0.1M $\beta$ : $\beta'$ -二甲基戊二酸 (毫升)	0.2N NaOH (毫升)	水 (毫升)
3.2	50	4.15	45.85
3.4	50	7.35	42.65
3.6	50	11.0	39.00
3.8	50	13.7	36.30
4.0	50	16.65	33.35
4.2	50	18.40	31.60
4.4	50	19.60	30.40
4.6	50	20.85	29.15
4.8	50	21.95	28.05
5.0	50	23.10	26.90
5.2	50	24.50	25.50
5.4	50	26.00	24.00
5.6	50	27.90	22.1
5.8	50	29.85	20.15
6.0	50	32.50	17.50
6.2	50	35.25	14.75
6.4	50	37.75	12.25
6.6	50	42.35	7.65
6.8	50	44.00	6.00
7.0	50	45.20	4.80
7.2	50	46.05	3.95
7.4	50	46.60	3.40
7.6	50	47.00	3.00

$\beta$ : $\beta'$ -二甲基戊二酸分子量 = 160.2, 0.1M 溶液含 16.02 克/升。

本缓冲系统适用于要求紫外吸收值较低的酶学研究工作。

丁二酸-氢氧化钠缓冲液(pH3.8~6.0)

pH (25°C)	0.2M 丁二酸 (毫升)	0.2N NaOH (毫升)	水 (毫升)	pH (25°C)	0.2M 丁二酸 (毫升)	0.2N NaOH (毫升)	水 (毫升)
3.8	25	7.5	67.5	5.0	25	26.7	48.3
4.0	25	10.0	65.0	5.2	25	30.3	44.7
4.2	25	13.3	61.7	5.4	25	34.2	40.8
4.4	25	16.7	58.3	5.6	25	37.5	37.5
4.6	25	20.0	55.0	5.8	25	40.7	24.3
4.8	25	23.5	51.5	6.0	25	43.5	22.5

丁二酸分子量=118.09, 0.2M 的溶液含 23.62 克/升。

磷酸缓冲液(pH5.8~8.0)

pH (25°C)	0.2M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (毫升)	0.2M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (毫升)	pH (25°C)	0.2M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (毫升)	0.2M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (毫升)
5.8	8.0	92.0	7.0	61.0	39.0
6.0	12.3	87.7	7.2	72.0	28.0
6.2	18.5	81.5	7.4	81.0	19.0
6.4	26.5	73.5	7.6	87.0	13.0
6.6	37.5	62.5	7.8	91.5	8.5
6.8	49.0	51.0	8.0	94.7	5.3

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 分子量=178.05, 0.2M 溶液含 35.61 克/升。

$\text{H}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 分子量=358.22, 0.2M 溶液含 71.64 克/升。

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 分子量=138.0, 0.2M 溶液含 27.6 克/升。

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 分子量=156.03, 0.2M 溶液含 31.21 克/升。



磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液(pH5.8~8.0)

pH	0.1M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (毫升)	0.1N NaOH (毫升)	水 (毫升)	pH	0.1M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (毫升)	0.1N NaOH (毫升)	水 (毫升)
5.8	50	3.6	46.4	7.0	50	29.1	20.9
5.9	50	4.6	45.4	7.1	50	32.1	17.9
6.0	50	5.6	44.4	7.2	50	34.7	15.3
6.1	50	6.8	43.2	7.3	50	37.0	13.0
6.2	50	8.1	41.9	7.4	50	39.1	10.9
6.3	50	9.7	40.3	7.5	50	40.9	9.1
6.4	50	11.6	38.4	7.6	50	42.4	7.6
6.5	50	13.9	36.1	7.7	50	43.5	6.5
6.6	50	16.4	33.6	7.8	50	44.5	5.5
6.7	50	19.3	30.7	7.9	50	45.3	4.7
6.8	50	22.4	27.6	8.0	50	46.1	3.9
6.9	50	25.9	24.1				

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 分子量 = 136.06, 0.1M 溶液含 13.61 克/升。

三甲基吡啶-盐酸缓冲液(pH6.4~8.3)

pH		0.2M 三甲基吡啶 (毫升)	0.2N HCl (毫升)	水 (毫升)
23°C	37°C			
6.4	6.4	25	22.50	52.50
6.6	6.5	25	21.25	53.75
6.8	6.7	25	20.00	55.00
6.9	6.8	25	18.75	56.25

(续上表)

pH		0.2M 三甲基吡啶 (毫升)	0.2N HCl (毫升)	水 (毫升)
23°C	37°C			
7.0	6.9	25	17.50	57.50
7.1	7.0	25	16.25	58.75
7.2	7.1	25	15.00	60.00
7.3	7.2	25	13.75	61.25
7.4	7.3	25	12.50	62.50
7.5	7.4	25	11.25	63.75
7.6	7.5	25	10.00	65.00
7.7	7.6	25	8.75	66.25
7.8	7.7	25	7.50	67.50
7.9	7.8	25	6.25	68.75
8.0	7.9	25	5.00	70.00
8.1	8.2	25	3.75	71.25
8.2	8.3	25	2.50	72.5

2,4,6-三甲基吡啶分子量=121.18, 0.2M 溶液含 24.24 克/升。

巴比妥钠-盐酸缓冲液 (pH6.8~9.6)

pH (18°C)	0.04M 巴比妥钠 (毫升)	0.2N HCl (毫升)	pH (18°C)	0.04M 巴比妥钠 (毫升)	0.2N HCl (毫升)
6.8	100	18.4	7.4	100	15.3
7.0	100	17.8	7.6	100	13.4
7.2	100	16.7	7.8	100	11.47

(续上表)

pH (18°C)	0.04M 巴比妥钠 (毫升)	0.2N HCl (毫升)	pH (18°C)	0.04M 巴比妥钠 (毫升)	0.2N HCl (毫升)
8.0	100	9.39	9.0	100	1.65
8.2	100	7.21	9.2	100	1.13
8.4	100	5.21	9.4	100	0.70
8.6	100	3.82	9.6	100	0.35
8.8	100	2.52			

巴比妥钠盐分子量 = 206.2, 0.04M 溶液含 8.25 克/升。

## Tris-缓冲液(pH7.1~8.9)

pH (25°C)	0.1M Tris (毫升)	0.1N HCl (毫升)	水 (毫升)	pH (25°C)	0.1M Tris (毫升)	0.1N HCl (毫升)	水 (毫升)
7.1	50	45.7	4.3	8.1	50	26.2	23.8
7.2	50	44.7	5.3	8.2	50	22.9	27.1
7.3	50	43.4	6.6	8.3	50	19.9	30.1
7.4	50	42.0	8.0	8.4	50	17.2	32.8
7.5	50	40.3	9.7	8.5	50	14.7	35.3
7.6	50	38.5	11.5	8.6	50	12.4	37.6
7.7	50	36.6	13.4	8.7	50	10.3	39.7
7.8	50	34.6	15.4	8.8	50	8.5	41.5
7.9	50	32.0	18.0	8.9	50	7.0	43.0
8.0	50	29.2	20.8				

Tris 即三羟甲基氨基甲烷  $\left( \begin{array}{c} \text{HOCH}_2 \diagup \text{CH}_2\text{OH} \\ \text{C} \\ \text{HOCH}_2 \diagdown \text{NH}_2 \end{array} \right)$  分子量 = 121.14, 0.1M 溶液含 12.114 克/升。

硼砂-硼酸缓冲液(pH7.4~9.0)

pH	0.05M 硼砂 (毫升)	0.2M 硼酸 (毫升)	pH	0.05M 硼砂 (毫升)	0.2M 硼酸 (毫升)
7.4	10	90	8.2	35	65
7.6	15	85	8.4	45	55
7.8	20	80	8.7	60	40
8.0	30	70	9.0	80	20

硼砂  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  分子量=381.43, 0.05M 溶液含 19.07 克/升。

硼酸分子量=61.84, 0.2M 溶液含 12.37 克/升。

硼砂易失去结晶水, 必须在带塞的瓶中保存, 硼砂也可用半中和的硼酸溶液代替。

硼酸-氯化钾-氢氧化钠缓冲液(pH8.0~10.2)

pH	0.1M $\text{KCl-H}_3\text{BO}_4$ (毫升)	0.1N NaOH (毫升)	水 (毫升)
8.0	50	3.9	46.1
8.1	50	4.9	45.1
8.2	50	6.0	44.0
8.3	50	7.2	42.8
8.4	50	8.6	41.4
8.5	50	10.1	39.9
8.6	50	11.8	37.2
8.7	50	13.7	36.3
8.8	50	15.8	34.2
8.9	50	18.1	31.9
9.0	50	20.8	29.2
9.1	50	23.6	26.4



(续上表)

pH	0.1M KCl-H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub> (毫升)	0.1N NaOH (毫升)	水 (毫升)
9.2	50	26.4	23.6
9.3	50	29.3	20.7
9.4	50	32.1	17.9
9.5	50	34.6	15.4
9.6	50	36.9	13.1
9.7	50	38.9	11.1
9.8	50	40.6	9.4
9.9	50	42.2	7.8
10.0	50	43.7	6.3
10.1	50	45.0	5.0
10.2	50	46.2	3.8

0.1M KCl-H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> 混合液各含 7.455 克/升 KCl 和 6.184 克/升 H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>。

### 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(pH8.6~10.6)

pH	0.2M 甘氨酸 (毫升)	0.2N NaOH (毫升)	pH	0.2M 甘氨酸 (毫升)	0.2N NaOH (毫升)
8.6	50	4.0	9.6	50	22.4
8.8	50	6.0	9.8	50	27.2
9.0	50	8.8	10.0	50	32.0
9.2	50	12.0	10.4	50	38.6
9.4	50	16.8	10.6	50	45.5

甘氨酸分子量=75.07, 0.2M 溶液含 15.01 克/升。

硼砂-氢氧化钠缓冲液(pH9.3~10.7)

pH (25°C)	0.025M 硼砂 (毫升)	0.1N NaOH (毫升)	水 (毫升)
9.3	50	3.6	46.4
9.4	50	6.2	43.8
9.5	50	8.8	41.2
9.6	50	11.1	38.9
9.7	50	13.1	36.9
9.8	50	15.0	35.0
9.9	50	16.7	33.3
10.0	50	18.3	31.7
10.1	50	19.5	30.5
10.2	50	20.5	29.5
10.3	50	21.3	28.7
10.4	50	22.1	27.9
10.5	50	22.7	27.3
10.6	50	23.3	26.7
10.7	50	23.8	26.2

硼砂  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  分子量 = 381.43, 0.025M 溶液含 9.535 克/升。

碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液(pH9.2~10.8)

$\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  存在时不得使用

pH		0.1M $\text{Na}_2\text{CO}_3$ (毫升)	0.1M $\text{NaHCO}_3$ (毫升)
20°C	37°C		
9.16	8.77	10	90
9.40	9.12	20	80

(续上表)

pH		0.1M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (毫升)	0.1M NaHCO <sub>3</sub> (毫升)
20°C	37°C		
9.51	9.40	30	70
9.78	9.50	40	60
9.90	9.72	50	50
10.14	9.90	60	40
10.28	10.08	70	30
10.53	10.28	80	20
10.83	10.57	90	10

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>·10H<sub>2</sub>O 分子量=286.2, 0.1M 溶液含 28.62 克/升。

NaHCO<sub>3</sub> 分子量=84.0, 0.1M 溶液含 8.40 克/升。

磷酸氢二钠-氢氧化钠缓冲液 (pH11.0~11.9)

pH (25°C)	0.5M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (毫升)	0.1N NaOH (毫升)	水 (毫升)
11.0	50	4.1	45.9
11.1	50	5.1	44.9
11.2	50	6.3	43.7
11.3	50	7.6	42.4
11.4	50	9.1	40.9
11.5	50	11.1	38.9
11.6	50	13.5	36.5
11.7	50	16.2	33.8
11.8	50	19.4	30.6
11.9	50	23.0	27.0

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 分子量=178.05, 0.5M 溶液含 89.03 克/升。

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 分子量=358.22, 0.5M 溶液含 179.11 克/升。

### 氯化钾-氢氧化钠缓冲液(pH12.0~13.0)

pH (25°C)	0.2M KCl (毫升)	0.2N NaOH (毫升)	水 (毫升)
12	25	6.0	69.0
12.1	25	8.0	67.0
12.2	25	10.2	64.8
12.3	25	12.8	62.2
12.4	25	16.2	58.8
12.5	25	20.4	54.6
12.6	25	25.6	49.4
12.7	25	32.2	42.8
12.8	25	41.2	33.8
12.9	25	53.0	22.0
13.0	25	66.0	9.0

0.2M 氯化钾(KCl)含 14.919 克/升。

## 11. pH 计测溶液 pH 的原理和步骤

### 一、基本原理

溶液中 pH 值的测定方法通常有两种,即比色法和电位法。

比色法是利用酸碱指示剂和氢离子的反应,在不同的 pH 值时,酸碱指示剂所呈现的颜色不同来进行测定。如果待测液中有胶体存在对色素有吸附作用,会影响显色的程度,又溶液是有色的或混浊的就不能采用比色法测定 pH 值。因此它有局限性。

电位法则能运用于有色、浑浊及胶状溶液的 pH 值测定。电位法的测定原理简述如下:



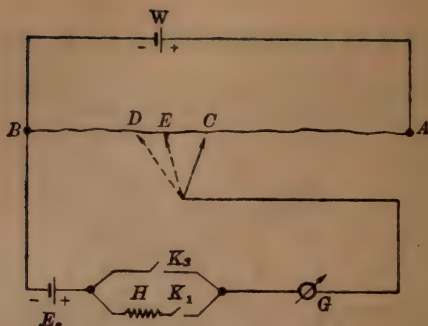


图 40 电位法测定原理简图

线路中 AB 是一电阻线，它的全长中具有相同的横断面，AB 间的电动势沿着导线而均匀地降落。当开关  $K_2$  接通待测电池  $E_x$  时，线路中有两个方向相反的电动势，即  $CGE_x$  与  $BE_xG$ ，G 为一电流计。当滑动触头沿 AB 电阻线滑动到 D 处时，电流计指示电流为 0，此时二个相反的电动势达到平衡，BD 两端的电位差恰好等于待测电池  $E_x$  的电动势。因为 AB 全长具有相同的横断面，故 BD 间电动势为  $\frac{BD}{AB} \times E$ 。E 为电池 W 的电动势。

根据上述电位测定的原理设计了 pH 计。它是通过测定由指示电极、参比电极和待测溶液所组成的电池的电动势，从而测出待测液的 pH。

指示电极的电位与其所在的待测样品溶液的 pH 值有一定关系，随着样品溶液的氢离子浓度不同，在电极上形成的电位也不同。但是单电极的电位是无法测量的，必须用一个电极的电位是恒定值的参比电极与指示电极一起在样品溶液中形成一个电池，而测此电池的电动势来测出样品溶液的 pH 值。

一般的 pH 指示电极有玻璃电极、氢电极、氢醌电极等。最常用的是玻璃电极。最常用的参比电极是甘汞电极。

玻璃电极主要部分是一个特殊玻璃制成的球，球的下半部为厚度

约 0.2 毫米的玻璃膜，它是一种半透性膜，仅能让  $H^+$  通过，当两种不同  $H^+$  浓度的溶液以此膜相隔后， $H^+$  就由较浓的溶液向较稀的溶液扩散，因此玻璃电极膜的内外产生一个电位差，它的大小决定于膜内外溶液的氢离子浓度。玻璃膜内通常装入 0.1N 盐酸溶液，带氯化银的银丝作内参考电极，使玻璃电极与 pH 计相连接。

甘汞电极是一玻璃容器，在底端焊有铂丝，将纯金属汞倒入铂丝的底部，其量足使铂丝淹没。在汞表面加入汞和氯化钾仔细研磨过的糊状甘汞 ( $Hg_2Cl_2$ )，将不同浓度的氯化钾溶液装入其上即成甘汞电极，一般常装入饱和氯化钾溶液。甘汞电极具有稳定的电位，而且随温度的变化也小。

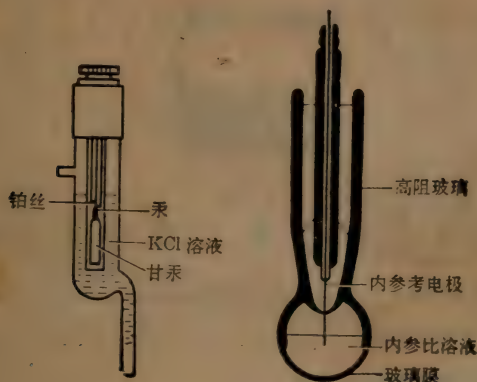


图 41 二种电极构造图

## 二、雷磁 25 型酸度计测 pH 的操作方法

1. 装上玻璃电极(接一极)和甘汞电极(接+极)。
2. 电子管预热: 接通电源并开启电源开关, 使电子管温热 10~15 分钟。旋钮 1 调到 7~0 或 7~14 (根据待测液 pH 而定), 旋钮 2 拨到 pH, 旋钮 3 调到待测液温度处。此时指针应指向 7 处, 否则转动零点调节旋钮, 调节指针指向 7。

3. 校正: 在一清洁的烧杯内装上与待测液 pH 相近的标准 pH 溶

液，将玻璃电极与甘汞电极浸入溶液中，按下读数按钮，调节定位旋钮使指针指向标准液 pH 处；放开读数按钮，调节零点旋钮使指针再指示 7，再按下读数按钮，调节定位旋钮使指针指向标准液 pH 处，按此步骤反复调节，直至测得标准液 pH 值读数不变为止。这时定位旋钮已固定，不能再变动。移去标准溶液，用蒸馏水冲洗电极，以滤纸轻轻吸干电极上水分。

4. 样品溶液 pH 值测定：将样品溶液装入清洁烧杯内，电极浸没于杯中。按下读数按钮，直接读得被测液 pH 值。移去被测液，以蒸馏水洗玻璃电极。将玻璃电极浸在干净蒸馏水中。

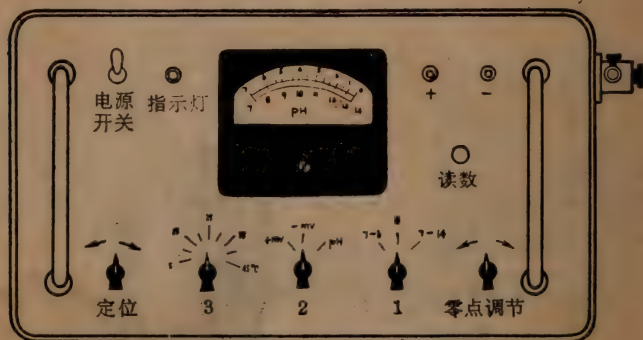


图 42 pH 计示意图

### 三、使用玻璃电极注意点

1. 每次校正、测定前后均应用蒸馏水将电极充分洗净。使用新的玻璃电极前，需预先在蒸馏水中浸泡 24 小时，使电动势稳定后才能使用，用后仍浸泡在蒸馏水中。

2. 玻璃电极下端球面非常脆弱，极易碰破，使用时应特别小心。放置电极时可使甘汞电极略低于玻璃电极，以免玻璃电极碰到杯底。

3. 测定液的 pH 大于 10 时要用特制的锂玻璃电极，如用玻璃电极会产生误差。

4. pH 值与溶液的温度有关，所以标准溶液与被测液的温度应相近或相同。

常用标准 pH 溶液

溶 液	不 同 温 度 (°C) 时 pH 值								
	0	10	20	25	30	38	40	56	60
0.1M 盐酸	1.10	1.10	1.10	1.10	1.10	1.10	1.10	1.11	1.11
0.05M 四草酸氢钾 ( $\text{KHC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	1.67	1.67	1.68	1.68	1.69	—	1.70	1.71	1.73
饱和酒石酸氢钾	—	—	—	3.56	3.55	3.54	3.54	3.55	3.57
0.05M 邻苯二甲酸氢钾	4.01	4.00	4.00	4.01	4.01	4.02	4.03	4.06	4.10
0.025M 琥珀酸氢钠 } 0.025M 琥珀酸钠 }	5.46	5.42	—	5.40	—	5.41	—	—	—
0.01M 硼砂	9.46	9.33	9.22	9.18	9.14	9.07	9.07	9.01	8.96
0.025M 碳酸氢钠 } 0.025M 碳酸钠 }	10.32	10.18	—	10.12	—	9.91	—	—	—
0.01M 磷酸三钠	—	—	—	11.72	—	11.38	—	—	—
0.025M 磷酸二氢钾 } 0.025M 磷酸氢二钠 }	6.98	6.92	6.88	6.86	6.85	6.84	6.84	6.83	6.84

## 12. 分光光度法

### 一、比色分析法原理

比色分析法是测定微量物质的方法之一。许多物质本身具有一定颜色,如高锰酸钾溶液呈紫红色;也有许多物质本身并无颜色,但当加入适当的显色剂后能生成有色物质。这种有色物质的溶液对通过的光能部分地吸收,而使透出的光强度减弱。有色物质的浓度越大,颜色越深,则对光的吸收越多,透出的光就越弱。因而在一定条件下,利用溶液颜色的深浅,使透过或吸收光的量不同,来测定溶液中物质含量的方



法称比色分析法。比色分析法具有灵敏度高、快速简便、仪器设备简单等特点,目前已成为测定微量物质应用最广泛的方法之一。

实验证明,当一束单色光(具有一定波长的光)通过有色溶液后,被吸收的光量与溶液的浓度、液层的厚度以及入射光的强度有关,这就是物质(均匀而透明的固体、液体或气体)对光吸收的规律,即光吸收定律,又称比尔(Beer)定律,它是比色分析法的定量基础。

设入射光的强度为  $I_0$ , 溶液的浓度为  $C$ , 液层厚度为  $L$ , 透过光的强度为  $I$  (如图 41), 则透光率  $T$  (常用百分透光率表示) 与溶液浓度和液层厚度有如下关系:

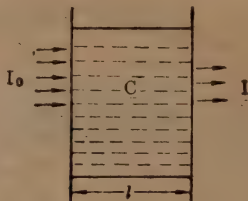


图 43 光的吸收示意图

$$T = \frac{I}{I_0} = 10^{-KCL}$$

式中两项取对数则得

$$\lg \frac{I}{I_0} = -KCL$$

$$\lg \frac{I_0}{I} = KCL$$

$\lg \frac{I_0}{I}$  表示光线通过溶液时被吸收的程度, 通常称为消光度(E)或光密度(OD)。如果光吸收程度越大, 则  $I$  越小, 消光度E的值就愈大。

$$E = KCL$$

式中K为一常数, 称为消光系数, 与入射光的波长和溶液中物质的性质有关。如果溶液浓度以克分子/升表示, 液层厚度以厘米表示, 则此常数称为克分子消光系数, 用  $\epsilon$  表示, 即  $E = \epsilon CL$ , 它的意义为“浓度

为 1 克分子溶液,放在 1 厘米厚的比色皿中,在一定波长下测得的光密度数值。它是溶液吸收光能力的量度。 $\epsilon$  值愈大,单位克分子浓度的有色化合物的颜色愈深,测定灵敏度愈高,即可测定的浓度愈小。 $\epsilon$  是每个有色物质在一定波长下的特征常数,可用此鉴定物质。

## 二、比色分析方法

建立在光吸收定律基础上的比色分析法有两类,即目视比色法和分光光度法。

目视法是通过肉眼直接观察,来比较溶液颜色的深浅,确定溶液浓度的方法。这种方法无须任何仪器,但由于肉眼分辨力有限,准确度不高,适合于粗含量分析和野外工作。

分光光度法是以一定波长的光通过溶液,透出的光照到光电池或光电管上,产生光电流,在微电计上以光密度或透光率表示出来,从而求得被测物含量的方法。分光光度法通常是在某一种单色波长和固定的液层厚度(固定的比色皿)条件下,配制一系列已知的不同浓度的标准溶液,在光电比色计上分别测出它们的消光度,然后以光密度 OD 为纵坐标,相应的浓度为横坐标作出标准曲线,待测样品按标准溶液相同方法处理,并测得光密度,从标准曲线上查出相应的浓度。

光通过溶液时,除了有色物质对光有吸收外,溶剂、试剂和比色皿对光都有吸收,从而会引起分析误差,为此必须采用“空白溶液”作参比。空白溶液仅仅是不含被测物质,而其他溶剂、试剂和处理条件与被测溶液完全相同。测定时先测空白溶液,调节仪器使空白溶液的透光率为 100%,此时溶液的光密度为零,然后测定欲测溶液的光密度。因此测定被测溶液的光密度所用的光源,实际上相当于采用通过空白溶液后的光作为光源强度为  $I_0$ ,而透过被测溶液的光强度为  $I$ ,测得的消光值即能反映被测溶液的浓度。

$$E = \lg \frac{I_0 (\text{透过空白溶液的光强度})}{I (\text{透过被测溶液的光强度})}$$

分光光度法是目前应用最广泛的仪器分析方法之一,它快速简便,准确度高。

### 三、溶液的颜色和吸收光波的选择

分光光度法中,通过溶液的入射光必须采用一定波长的单色光。我们通常所见的白光(如日光或白炽灯光)是波长为  $400\sim 750$  毫微米的复合光,它是由红、橙、黄、绿、青、蓝、紫等光按一定比例混合而成的。当一束白光通过有色溶液时,溶液吸收了其中部分波长的光,而把其余波长的光反射和透射出来,人们所看到溶液的颜色就是反射和透射出来的这一部分波长光的颜色。例如高锰酸钾水溶液吸收了蓝、绿、黄和橙色波长的光,反射和透射出红色和紫色光波,因此它呈紫红色。白光通过有色溶液,被溶液吸收的一部分光的颜色与溶液本身所呈现的颜色互为补色,如果这二部分光加在一起就复合成白光。

如果用不同波长的光通过浓度一定的溶液,测得每一波长下相应的消光度,然后以波长为横坐标,光密度 OD 为纵坐标作图,可得一曲线,这种曲线反映了该种物质的溶液对不同波长光的吸收能力,称为吸收曲线(图 44)。

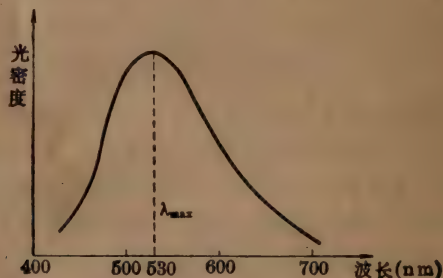


图 44  $\text{KMnO}_4$  溶液的吸收曲线

比色分析法中总是选用被溶液吸收最大的单色光波进行测定,这样才能因溶液浓度微小变化而引起光密度的较大变化,以提高比色分析的灵敏度。有时在最大吸收波长处干扰离子也有吸收,则可根据具体情况另选合适波长,以消除干扰。

纯粹的单色光仅是一种理想情况,在光电比色计中常用滤光片来得到近似的单色光,滤光片透过的光包括一定波长范围。而欲得到波

长范围更狭的光可利用棱镜分光，在分光光度计中则是利用棱镜来获得单色光，其波长范围可达几个毫微米甚至更窄，从而可使分析的灵敏度、准确度和选择性有很大提高。采用三棱镜分光还可使单色光连续地依次通过溶液，便于测定该溶液对每一波长的吸收，作出吸收光谱曲线。普通比色计和分光光度计使用的波长范围在400~700毫微米，而紫外分光光度计的波长范围扩大到紫外区，波长范围在200~1000毫微米，因此对某些虽无颜色，但具有对紫外光波吸收的功能团的化合物的溶液，就可利用紫外光波进行测定，从而大大增加测定物质的范围。具有紫外吸收特征的化合物，其紫外吸收峰的波长和吸收强度是一个物理常数，作为鉴定时的常用数据。紫外分光光度计常用来进行单组份或多组份混合物的定性和定量测定。

#### 四、比色分析的误差

引起比色分析的误差主要原因有二方面，一是方法的误差，二是仪器的误差。

方法误差主要来源于比色测定时溶液浓度、操作条件和干扰物质的存在。当溶液的总浓度改变时可能引起有色物质的解离、结合或形成新的络合物，引起溶液浓度的变化与颜色深浅的变化不成比例，而使溶液的消光度不与被测物质的浓度成正比。只有在一定浓度范围内，光的吸收定律才能适用。通常光的吸收定律只适用于低浓度溶液，溶液浓度高时就会带来误差。显色条件必须严格控制，因为显色剂的用量、溶液的酸度、温度和反应时间都直接影响到生成的有色络合物的解离平衡，这些因素的变化能引起颜色深度的变化，从而影响比色测定的准确度。有些杂质也能与显色剂生成有色溶液而干扰测定，有的杂质与金属离子或显色剂产生稳定的无色络合物或沉淀，从而影响比色测定，因此在比色测定前要去除干扰物质。

仪器误差，是指光电比色计和分光光度计引起的误差。如电源电压波动使光源不稳定，光电池的疲劳使光电效应非线性，滤光片的质量或单色光器的狭缝宽度，比色皿厚度不一或不洁都会引起比色测定的误差。此外光密度太小( $<0.1$ )或太大( $>1$ )时，读数误差较大，而光



密度在  $0.1 \sim 1.0$  范围内,测定准确度较好。

## 五、常用分光光度计的构造和使用

### 1. 72 型分光光度计

这是一种简易型的初级分光光度计,波长范围为  $400 \sim 700$  毫微米。由单色光器、微电计和稳压电源三大部件组成。单色光是由白炽钨丝灯供给光源,通过一个光学玻璃棱镜及二个透镜组成的。由单色光器获得的光谱带较狭,单色光透过有色溶液的光线通过光电池将光能转变为电能,在高度灵敏的微电计上指示出相应的消光度或透光率。

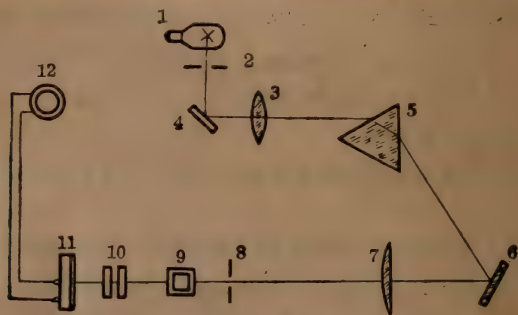


图 45 72 型分光光度计光学系统图

- 1.光源 2.进光狭缝 3.透镜 4.反射镜 5.棱镜 6.反射镜  
7.透镜 8.出光狭缝 9.比色器 10.光量调节器  
11.光电池 12.微电计

#### 操作步骤:

(1) 使用前先检查供电电源与仪器所标志的电压是否相符,然后插上电源。

(2) 把单色光器的光路闸门扳到“黑点”位置,将微电计电源打开,此时指示光斑出现在标尺上,用“0”位调节器将光斑准确地调到透光率标尺“0”位上。

(3) 打开稳压器电源开关和单色光源开关,把光路闸门扳到“红点”上,再以顺时针方向调节光量调节器,使微电计上的指示斑达到标尺上限附近,隔 10 分钟待硒光电池趋于稳定后再开始使用仪器。

(4) 将单色光器上的光路闸门重新扳至“黑点”处，再一次校正微电计的指示光斑于“0”位。

(5) 打开比色皿暗盒，取出比色皿架，将空白溶液放在架的第一格内，其余三只放待测溶液比色皿。

(6) 用波长调节器将所需波长调节至对准红线。打开光路闸门，这时空白溶液正好对在光路上，调节光量调节器以顺时针方向或逆时针方向轻轻旋动，使指示光斑正确地调到透光率 100% 读数上。

(7) 接着将比色皿定位装置的拉杆轻轻地拉出一格，使第二个比色皿进入光路，这时微电计上所指的读数即为该溶液的光密度和透光率，第三、第四个比色皿依次推入光路内，读取光密度。在调换比色皿溶液时，应关闭光路闸门，并核对微电计上的“0”位。

## 2. 721 型分光光度计

它是在 72 型的基础上革新的产品，在性能上有较大的提高。主要有五方面改进：第一，仪器的稳压电源、单色光器和测量读数部分都合装在一起，使用比 72 型方便；第二，采用低功率的白炽钨丝灯泡，功率比 72 型小三分之二，有利于延长灯泡使用率，又有利于仪器的维护；第三，721 型单色光器系统采用自准式光路结构，使单色器装校方便可靠；第四，稳压电源采用全晶体管电子结构，稳定精确度高；第五，光电转换元件采用 GD-7 型光电管，因此提高了对弱光的灵敏度，光谱范围也比 72 型宽，波长范围可从 350 毫微米延伸到 800 毫微米。

### 操作步骤：

(1) 使用前先检查供电电源与仪器所要求的电压是否相符，然后接通电源，打开比色皿暗盒盖，使电表指针处于“0”位，预热 20 分钟后，用波长调节器选用需要的单色光波。

(2) 将空白溶液的比色皿放在比色架的第一格，其余三只放待测溶液比色皿。将比色皿暗箱盖合上，这时空白溶液对在光路上，光电管见光，旋转光量调节器，使电表指针正确地指在 100% 透光率上。

(3) 轻轻拉动比色架固定拉杆，使第二个比色皿溶液处在光路中，这时电表指针所指的读数即为该溶液的光密度和透光率。依次推入第

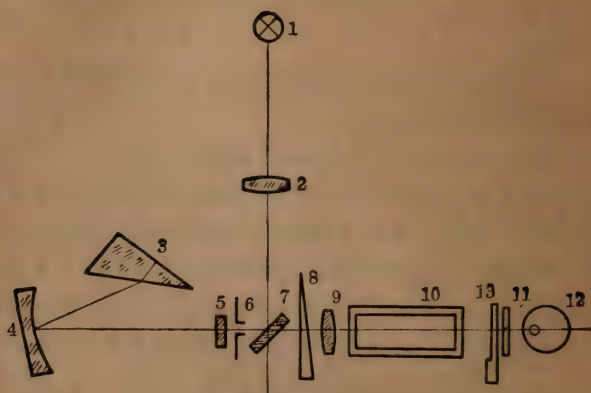


图 46 721 型分光光度计光学系统图

1. 光源灯 12V25W 2. 透镜 3. 棱镜 4. 准直镜 5. 保护玻璃  
6. 狭缝 7. 反射镜 8. 光栏 9. 聚光透镜 10. 比色皿 11. 保  
护玻璃 12. 光电管 13. 光门

三、第四个比色皿,读取其光密度。

(4) 放大器灵敏度挡的选择是根据不同的单色波长、光能量分别选用,灵敏度范围是第一档 $\times 1$ 倍,第二档 $\times 10$ 倍,第三档 $\times 20$ 倍。原则是使空白溶液良好地用光量调节器调整于 100%透光率处。

### 3. 751 分光光度计

它的波长范围为 200~1000 毫微米,可测定各种物质在紫外区、可见光及近红外区的吸收光谱。光学系统采用单光束自准式光路,在波长 320~1000 毫微米范围内用白炽钨丝灯作光源,在 200~320 毫微米范围内用氢弧灯作光源。单色光部件由狭缝、准直镜、棱镜等部件组成。入射狭缝和出射狭缝安置在同一狭缝机构上,可以同时关闭。狭缝宽度从 0~2 毫米可连续调节。准直镜是半径为 1000 毫米的球面镜,由准直镜反射的平行光,照亮整个棱镜面。棱镜是由石英材料制成的,对可见光和紫外光的吸收很少,几乎完全透明。光学系统中的透镜也是石英制成,适宜于紫外光区使用。光电管暗盒内装有紫敏光电管和红敏光电管,还有微电流放大器,用以将光能转变为电能。紫敏光电管对紫光

灵敏,使用波长为 200~625 毫微米。红敏光电管对红光灵敏,使用波长为 625~1000 毫微米。

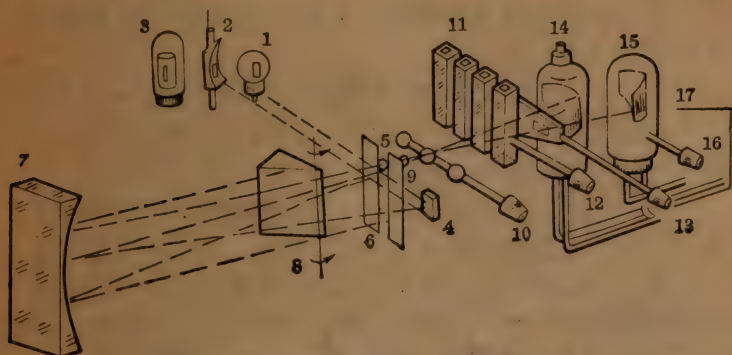


图 47 751 型分光光度计光学系统图

光源: 1. 钨丝灯 2. 凹面镜 3. 氢弧灯

单色器: 4. 平面镜 5. 石英窗 6. 弯曲狭缝 7. 准直镜 8. 石英棱镜 9. 石英透镜

测试室: 10. 滤光片架 11. 试样槽 12. 试样槽拉杆

接收部分: 13. 暗电流控制闸门 14. 紫敏光电管 15. 红敏光电管

16. 光电管滑动架 17. 接放大器

### 操作步骤:

(1) 打开仪器电源预热 10 分钟左右,使仪器稳定工作。

(2) 选择相应于波长的光源灯,比色皿和光电管。

(3) 灵敏度旋钮从左面“停止”位置顺时针方向旋转 3~5 圈。

(4) 将选择开关扳到“校正”处。

(5) 调节波长刻度到所需的波长上。

(6) 调节暗电流使电表指针到“0”。为了得到较高的正确度,每测量一次,暗电流分别校正一次。

(7) 将空白溶液放在比色皿架的第一格,其他三只放待测溶液。盖上暗盒盖,使空白溶液对准光路。

(8) 打开选择开关到“×1”上,拉开暗电流闸门,使单色光进入光电管。



(9) 调节狭缝，大致使电表指针到“0”位，而后用灵敏度旋钮细调，使指针正确地指在“0”位。

(10) 轻轻拉动比色皿架拉杆，使第一只待测溶液对入光路，这时电表指针偏离“0”位。

(11) 旋转读数电位器，使电表指针重新指到“0”位。这时读数电位器上所指E值即欲测溶液的光密度。接着拉动拉杆使第二、三只溶液对入光路，按相同方法读出E值。

(12) 在指针平衡后，要将暗电流闸门重新关上，以便保护光电管，勿使受光太长而疲劳。

(13) 当选择开关放在“ $\times 1$ ”时，透光率从0~100%，消光度从 $\infty \sim 0$ 。当透光率小于10%时，可选用“ $\times 0.1$ ”的选择开关，使获得较精确的数值，此时读出的透光率数值要除以10，相应的光密度值应加上1。

## 九、参 考 文 献

- [1] Egon Stahl, Thin-Layer Chromatography A Laboratory Handbook, p.807-814(1969).
- [2] J. P. Marais, J. Chromatog., 27, 321-323 (1967).
- [3] 别洛杰尔斯基著, 曹宗巽等译, 植物生物化学实验指导, 91 页(1956), 高等教育出版社。
- [4] 中国科学院上海生物化学研究所四室, 生物化学与生物物理进展, 3, 19 (1976)。
- [5] 潘家秀等编, 蛋白质化学研究技术, 1962, 科学出版社。
- [6] 北京大学生物化学教研室编, 生物化学实验指导, 1958, 人民教育出版社。
- [7] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. J. Biol. Chem. 193, 265(1951).
- [8] Folin, O. & Ciocalten, V. J. Biol. Chem. 73, 627(1927).
- [9] McKnight, G. S. Anal. Biochem. 78, 86(1977).
- [10] 上海市第六人民医院检验组编, 快速检验诊断资料汇编, 1972, 人民卫生出版社。
- [11] 莽克强等编, 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 1975, 科学出版社。
- [12] Clark, J. M., Experimental Biochemistry, 43-54 (1977).
- [13] 空军后勤部卫生部编印, 航空军医资料, 2, 36-41(1974)。
- [14] Kozo Narita, Hisayuki Matsuo & Terumi Nakajima, Protein Sequence Determination, Edited by Saul. B. Needleman p. 42 (1975).
- [15] 陈远聪等, 生物化学与生物物理进展, 1, 38(1975)。
- [16] 袁静明编, 凝胶层析法及其应用, 1975, 科学出版社。
- [17] Weber, K 等, J. Biol. Chem. 244, 4406 (1969).
- [18] Neuruth 著, The protein, Vol. 1, 180-225.
- [19] 鲁子贤, 生物化学与生物物理进展, 1, 42(1974)。
- [20] Schjerve, O. A., Anal. Biochem., 27, 473-483 (1969).
- [21] Abraham, G. N, et al., Anal. Biochem., 49, 547 (1972).
- [22] Saito. H., B. B. A. 72, 619 (1963).

- [23] Marmur, J., J. Mol. Biol., 3,208-218 (1961).
- [24] 中国科学院微生物研究所编, 核苷酸类物质的生产和应用资料汇编, 1971, 科学出版社。
- [25] E. 查加夫, I.N. 达维生著, 黄德民译, 核酸, 第一卷, 1963, 科学出版社。
- [26] 大沢省三, 堀田康雄, 蛋白质核酸酵素, 11(6), 107, 1966.
- [27] E. Volkin, W. E. Cohn, Methods of Biochemical Analysis, 1,287 (1954).
- [28] Harris-Warrick, R. M., Elekana, Y., Ehrlich, S. D., & Lederberg, J., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 2207-2211(1975).
- [29] Thomas, M. et al., J. Mol. Biol., 91, 315-328 (1975).
- [30] 全国应用微生物展览会编, 酶制剂的生产和测定方法, 115 页。
- [31] 龚澜真等译, 实用生物化学, 上册, 218 页。
- [32] Shlomo Hestrin, David S. Feingold, and Michael Schramm, Methods in Enzymology. Vol. 1, 251-257.
- [33] Day, P. M. et al. "Biochemistry of  $\alpha$ -galactosidase," Advance of Enzymology 36, 91 (1972).
- [34] 沈仁权等, 产  $\alpha$ -半乳糖苷酶嗜热芽孢杆菌的选育, 遗传学报, 6, 104(1979)。
- [35] Eisenthal, R. et al. The direct linear plot. A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters, Biochem. J. 139, 715 (1974).
- [36] Somogyi M., Notes on sugar determination, J. Biol. Chem. 195, 19 (1952).
- [37] 复旦大学生物化学教研组, 复旦学报, 1(1978), 66 页。
- [38] Nobuyuki Yamasaki, et. al., Agr. Biol. Chem., 37(6), 1507 (1973).
- [39] 中国科学院上海生化所三室, 生物化学与生物物理进展, 2(1975)。
- [40] 中国科学院北京植物所七室, 同上。
- [41] 国家海洋局第二海洋研究所, 醋酸纤维素反渗透膜, 内部资料, 1973 年。
- [42] H. ch. Curticus, Mare Rath, Clinical Biochemistry Principles and Methods, vol. 1, 1974.
- [43] 袁中一、刘树煌、袁静明编, 固相酶和亲和层析, 1975, 科学出版社。
- [44] 上海啤酒厂、中国科学院上海生物化学研究所编, 固相酶和分子筛在核苷酸生产中的应用, 1971。
- [45] 中国科学院上海生物化学研究所固相酶组, 生物化学与生物物理进展, 6 (1977)。



中科院植物所图书馆



S0011943

北京植物所

收到期 1981. 11. 16.

227570

58.173057

410

生物化学实验. 1981年

借者	还期	借者	还期
----	----	----	----

1984/8

8月26

16

58.173057

410

227570



封面设计 方仲华

科技新书目: 2 · 234

统一书号: 13119 · 924

定 价: (科四)0.97元